

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

***Laurocerasus Officinalis* Roem. BİTKİSİNİN ÇEŞİTLİ KISIMLARINDAN ELDE  
EDİLEN SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKTLARININ FENOLİK  
BİLEŞİKLER AÇISINDAN ANALİZİ VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN  
TAYİNİ**

**Gaye YUCAYURT  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Fikret AKDENİZ**

**HAZİRAN 2008  
KARS**

**Bu tez çalışması, 106T296 no'lu proje ile TÜBİTAK Temel Bilimler  
Araştırma Grubu tarafından desteklenmiştir.**

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

***Laurocerasus Officinalis* Roem. BİTKİSİNİN ÇEŞİTLİ KISIMLARINDAN ELDE  
EDİLEN SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKTLARININ FENOLİK  
BİLEŞİKLER AÇISINDAN ANALİZİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN  
TAYİNİ**

**Gaye YUCAYURT  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Fikret AKDENİZ**

**HAZİRAN 2008  
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Gaye YUCAYURT'un Yrd. Doç. Dr. Fikret AKDENİZ'in danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "**Laurocerasus Officinalis Roem. Bitkisinin Çeşitli Kısımlarından Elde Edilen Süperkritik Akışkan Ekstraktlarının Fenolik Bileşikler Açısından Analizi ve Antioksidan Aktivitelerinin Tayini**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ..**BAKLIĞI**... ile kabul edilmiştir.

06 / 06 /2008

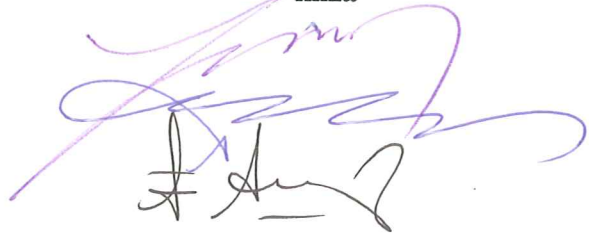
**Adı ve Soyadı**

**Baskan :** Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

**Üye :** Yrd. Doç. Dr. Gültekin GÖKÇE

**Üye :** Yrd. Doç. Dr. Fikret AKDENİZ

**imza**



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

Prof. Dr. Vahit ALIŞOĞLU  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

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

Çalışmada Karadeniz bölgesinin karakteristik bir bitkisi olan *Laurocerasus officinalis* Roem.'in yaprak kabuk ve gövdesinde elde edilen soxhlet ve süperkritik akışkan ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri ve içeriklerindeki fenolik bileşikler tayin edilmiştir. Çalışma kendisinden önce yapılan çalışmalardan, iki farklı ekstraksiyon metodu kullanılması, bitkinin yaprak, kabuk ve gövde ekstraktlarının aynı anda incelenmesi, ayrıca, parça büyüklüğü, zaman ve çözücü etkisi gibi kinetik parametrelerin de çalışılması nedeniyle farklılık getirmektedir. Literatür çalışmalarında genellikle klasik ekstraksiyon metodlarıyla ve bitkisel materyallerin daha çok yaprak ve meyve kısımlarıyla çalışılmıştır. Yeni gelişmekte olan bir teknik olan süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SAE), son zamanlarda antioksidan etki gösteren fenolik bileşiklerin ekstraksiyonlarında da kullanılmaktadır. Bu tarz çalışmalarda genellikle çeşitli kimyasal metodlarla antioksidan aktivite ölçümü yapılmakta bazılarında ise antioksidan etki gösteren bileşiklerin miktar tayinleri gerçekleştirilmektedir. Yapılan literatür taramasında bu tür çalışmalarda kinetik kısım içeren çalışmalara fazla rastlanmamıştır. Oysa ekstraksiyonun optimize edilebilmesi için bu çeşit bilgilere de ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasına katkıda bulunan başta danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Fikret AKDENİZ'e teşekkürlerimi sunarım. Yine bu çalışmada emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Gültekin GÖKÇE'ye, Yrd. Doç. Dr. Fatma GÜNEŞ'e, Doç. Dr. Sinan AKGÖL'e, Doç. Dr. Murat KÜÇÜK'e, Yrd. Doç. Dr. Hanife ÖZBAY'a, Doktora Öğrencisi Emine AKYÜZ'e, Yüksek Lisans Öğrencisi İnan DURSUN'a, Kadir TEPEBAŞ'a ve Erdinç YAVUZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmada benim için desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen bana zaman ayıran değerli aileme, öncelikle babam Yavuz YUCAYURT'a, annem Fatma Vedia YUCAYURT'a, ablam Rahşan YUCAYURT KOÇER'e ve kardeşim Sidar İskender YUCAYURT'a teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	i
<b>ÖZET</b>	ii
<b>ABSTRACT</b>	iii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	vii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Antioksidanlar	2
2.2. Serbest Radikaller	2
2.2.1. Yağların Otoksidasyonu ile Oluşan Serbest Radikaller	4
2.2.2. Otoksidasyonun Engellenmesi	7
2.2.3. Serbest Radikaller ve Serbest Oksijen Radikallerinin Patolojik Sonuçları	8
2.3. Antioksidanların Etki Mekanizması-Radikal Nötralizasyonu	9
2.4. Gıda Endüstrisinde Antioksidanlar (Gıda Koruyucuları)	11
2.4.1. Gıdalarda Oksidatif Bozunma ile Serbest Radikal Oluşumu ve Oluşan Olumsuz Etkilerinin Giderilmesi	11
2.5. Doğal Antioksidanların Yapıları ve Kaynağı	13
2.5.1. Tokoferoller	13
2.5.2. Flavonoidler	14
2.5.3. Fenolik asitler	16
2.5.4. Askorbik asit	17
2.5.6. Antioksidan enzimler “serbest radikalleri yakalayan enzimler” (superoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz)	18
2.6. Gıdalarda Bulunan Antioksidanlar	18

2.7.	Fenolik Antioksidan Bileşikler	19
2.7.1.	Fenollerin İzolasyonu ve Antioksidan Kapasitelerinin Ölçümü	22
2.7.2.	Fenolik Bileşiklerin Analiz Yöntemleri	22
2.8.	Antioksidant Madde Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler	23
2.8.1.	Sıvı Çözücü Ekstraksiyonları	24
2.8.2.	Katı-Faz Ekstraksiyonları	24
2.8.3.	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	25
2.8.3.1.	Süperkritik Akışkanlar ve Özellikleri	25
2.8.3.2.	Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun fenolik bileşiklere uygulanması	28
2.9.	Bitkilerin odunsu ve kabuklu kısımlarından fenolik bileşik ekstraksiyonu	29
2.10.	Çalışma Materyali Hakkında Botanik Bilgi ve Çalışmanın Amacı	30
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE METOD</b>	<b>33</b>
3.1.	Numune Hazırlama	33
3.2.	Kullanılan Malzeme, Çözücü, Reaktif ve Standart Maddeler	33
3.3.	Ekstraktların Hazırlanması	34
3.3.1.	Soxhlet ekstraktlarının hazırlanması	34
3.3.2.	Süperkritik akışkan ekstraktlarının hazırlanması	34
3.3.2.1.	Ana çalışma kısmı ekstraktlarının hazırlanması	35
3.3.2.2.	Kinetik çalışma kısmı ekstraktlarının hazırlanması	36
3.4.	Ekstraktların Toplam Fenolik Madde İçeriklerinin ve Antioksidan Aktivitelerinin Ölçülmesi	37
3.4.1.	Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Tayini	37
3.4.2.	DPPH radikal temizleme antioksidan aktivite tayini	38
3.4.3.	Fe-III iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) tayini	39
3.5.	HPLC-UV Analizleri	40

3.5.1. Standartlar ve Kalibrasyon	41
3.5.2. LC-UV Koşulları	41
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	<b>42</b>
4.1. Ana Çalışma Kısmı Ekstraktları Üzerinde Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	42
4.1.1. Yapılan ekstraksiyonların verim yüzdeleri	42
4.1.2. Toplam fenolik madde tayini deneylerinden elde edilen bulgular	43
4.1.3. DPPH radikal temizleme antioksidan aktivite tayini deneylerinden elde edilen bulgular	46
4.1.4. Fe-III iyonu indirgeme antioksidant gücü (FRAP) deneylerinden elde edilen bulgular	50
4.1.5. RP-LC-UV analizlerinden elde edilen bulgular	52
4.1.5.1. Standartlar ve Kalibrasyon	52
4.1.5.2. Ekstraktların HPLC-UV analizi için seyreltilmeleri	53
4.1.5.3. Ekstraktlardan fenolik bileşiklerin sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonu	53
4.1.5.4. LC-UV Koşulları	54
4.1.5.5. LC-UV İçin Deteksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi	54
4.1.5.6. LC-UV Metot Geliştirme	55
4.2. Kinetik Çalışma Kısmı Ekstraktları Üzerinde Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	65
4.2.1. Parçacık büyüklüğünün etkisi	65
4.2.2. Ekstraksiyon süresinin etkisi	70
4.2.3. Ekstraksiyon çözücüsünün etkisi	74
4.3. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde İçerikleri ile Antioksidan Aktiviteleri Arasındaki İlişki	78
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>81</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>87</b>

<b>7. ÖZGEÇMİŞ</b>	96
<b>8. EKLER</b>	97
8.1. Seçimli Ekstraksiyon Öncesi	97
8.2. Seçimli Ekstraksiyon Sonrası	104



## ÖZET

Bu çalışmada , Türkiyenin Doğu Karadeniz Bölgesinden toplanan *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinin üç ayrı kısmına, süperkritik sıvı ekstraksiyonu ve Soxhlet ekstraksiyonu uygulandı. Üç ayrı kısım için yapılan iki ekstraksiyon metodunun ekstraktları karşılaştırıldı. İki metoda ait altı ekstrakta Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde içerik tayini, DPPH radikal temizleme yöntemi ile antioksidan aktivite tayini, Fe-III iyonu indirgeme metodu ile antioksidant gücü (FRAP) tayini, RP-LC-UV analizleri ile fenolik bileşik içeriği tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Ayrıca yapılan deneylerde toplam fenolik madde içeriğine ve antioksidant aktivitesine etki eden parçacık büyüklüğü, ekstraksiyon zamanı, ve çözücü polaritesi gibi parametrelerin etkisi araştırıldı.

Sonuç olarak, *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinin yaprak, kabuk ve gövde numunelerinden genelde yüksek verimi süperkritik ekstraksiyon sağladı. Yaprak ve kabuk ekstraktları toplam fenolik içerik açısından gövde ekstraktlarından daha yüksek bulundu. FRAP ve DPPH testlerinde genel olarak kabuk ekstraktlarının daha iyi sonuçlar ortaya koyduğu gözlemlendi. RP-LC-UV analizlerinde ekstraktlarda en fazla klorojenik asidin, daha sonra da gallik asidin bulunduğu gözlemlendi. Deneylerde kullanılan numunelerin parçacık büyüklüğü arttıkça toplam fenolik içerik düşüş göstermiştir buna paralel olarak antioksidant aktivite de azalmıştır. Ekstraksiyon süresinin artırılmasıyla ekstraktların toplam fenolik madde miktarı artarken, antioksidant aktivite azalmıştır. Süperkritik ekstraksiyon için en uygun çözücünün metanol olduğu bulunmuştur. Optimum ekstraksiyon şartları için, numune parçacık büyüklüğünün 125-250 µm olduğu ve en uygun ekstraksiyon zaman aralığının ise 30 dk. olduğu bulunmuştur.

2008, 126 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Laurocerasus officinalis* Roem.; antioksidant aktivite; Soxhlet ekstraksiyon; süperkritik ekstraksiyon; fenolik içerik

## ABSTRACT

In this study, three different parts (leaves, barks and stems) of the plant, *Laurocerasus officinalis* Roem. from Eastern Black Sea Region of Turkey, were subjected to supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction. In these experiments, the effects of sample particle size, extraction time interval, and solvent polarity on the total phenolic contents and antioxidant activities of the supercritical extracts were investigated. In addition to this, determination of total phenolic content by using Folin-Ciocalteu method, determination of antioxidant activity by using DPPH radical scavenging activity method, determination of antioxidant power (FRAP) by using Fe-III ion reducing method and RP-LC-UV analysis of phenolic profile of the extracts were performed. Results were compared within two extraction methods.

As a result, it was found out that, for leaves, barks and stems of *Laurocerasus officinalis* Roem. samples, the highest extract efficiency obtained from supercritical fluid extraction method. Total phenolic content were found higher in both supercritical and Soxhlet extracts of leaves and barks than the extracts of stems. In tests of FRAP and DPPH, better results are observed from both supercritical and Soxhlet extracts of barks. In RP-LC-UV analysis, klorogenic acid and gallic acid distinguished the maximum level among the phenolic components. For *Laurocerasus officinalis* Roem., while the particle size of the sample was getting increase, the total phenolic contents, and in parallel, antioxidant activities of supercritical extracts were getting decrease. In extended extraction time intervals, while the total phenolic contents of the extracts were getting increase, their antioxidant activities were getting decrease. Methanol was found to be the best choice among the solvents used in supercritical extractions. Optimum supercritical extraction conditions were obtained as sample particle size was 125-250  $\mu\text{m}$ , extraction time interval was max 30 min, and extraction solvent was methanol.

2008, 126 pages

**Keywords:** *Laurocerasus officinalis* Roem.; antioxidant activity; Soxhlet extraction; supercritical extraction; phenolic content

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>BHA</b>	:Bütillenmiş Hidroksi Anisol
<b>BHT</b>	:Bütillenmiş Hidroksi Tolüen
<b>DNA</b>	:Deoksiribonükleik Asit
<b>DHA</b>	:Dehidroksiaskorbik asit
<b>DPPH</b>	: $\alpha,\alpha$ -Difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil
<b>UV</b>	:Ultra Viole (Mor Ötesi) Spektrofotometrisi
<b>MS</b>	:Kütle Spektrometrisi
<b>GC-MS</b>	:Kütle Spektrometrisi ile Birleştirilmiş Kapiler Gaz Kromatografisi
<b>LC-MS</b>	:Sıvı kromatografisi tekniği ile Birleştirilmiş Kütle Spektrometrisi
<b>HPLC</b>	:Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
<b>RP</b>	:Ters Faz
<b>HPLC-UV</b>	:Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Birleştirilmiş Ultra Viole Spektrofotometrisi
<b>GAE</b>	:Gallik Asit Eşdeğeri
<b>LGSC</b>	:Laurocerasus-Gövde-Süperkritik Ekstraktı
<b>LGSX</b>	:Laurocerasus-Gövde-Soxhlet Ekstraktı
<b>LKSX</b>	:Laurocerasus-Kabuk-Soxhlet Ekstraktı
<b>LKSC</b>	:Laurocerasus-Kabuk- Süperkritik Ekstraktı
<b>LYSX</b>	:Laurocerasus-Yaprak-Soxhlet Ekstraktı
<b>LYSC</b>	:Laurocerasus-Yaprak-Süperkritik Ekstraktı
<b>FRAP</b>	:Fe-III iyonu indirgeme antioksidant gücü
<b>RP-LC-UV</b>	:Ters Faz Sıvı Kromatografisi ile birleştirilmiş Ultra Viole Spektrofotometrisi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Şekil 1</b>	: Linoleik asit esterinin otooksidasyonu 6
<b>Şekil 2</b>	: E Vitaminine ve Bütillenmiş Hidroksi Toluene ait kimyasal yapılar 8
<b>Şekil 3</b>	: Askorbat radikalinin oluşumu 10
<b>Şekil 4</b>	: Flavonoidlere ait genel kimyasal yapı 14
<b>Şekil 5</b>	: Karbondioksit için faz diyagramı 26
<b>Şekil 6</b>	: Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri 43
<b>Şekil 7</b>	: Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği 44
<b>Şekil 8</b>	: Ekstraktların karşılaştırmalı toplam fenolik madde içerikleri 45
<b>Şekil 9</b>	: <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem bitkisinin metanolik Soxhlet ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri 47
<b>Şekil 10</b>	: <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem bitkisinin süperkritik metanol ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri 47
<b>Şekil 11</b>	: <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem bitkisinin metanolik Soxhlet ve süperkritik ekstraktları ile karşılaştırma maddelerinin DPPH radikalini % 50 temizleme konsantrasyonları 48
<b>Şekil 12</b>	: FRAP testinde artan C vitamini konsantrasyonuna bağlı absorbansta meydana gelen değişiklik 50
<b>Şekil 13</b>	: Numunelerin ve standart antioksidant olan Trolox'un FRAP değerleri 51
<b>Şekil 14</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar 55
<b>Şekil 15</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LYSX' e ait kromatogramlar 57
<b>Şekil 16</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar 60

<b>Şekil 17</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyondan sonra fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar	61
<b>Şekil 18</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LYSX'e ait kromatogramlar	62
<b>Şekil 19</b>	: Parçacık büyüklüğünün toplam fenolik madde içeriğine etkisi	67
<b>Şekil 20</b>	: <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem bitkisine ait farklı parçacık büyüklüğündeki numunelerden elde edilen ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri	68
<b>Şekil 21</b>	: Parçacık büyüklüğünün ekstraktların antioksidant aktiviteleri üzerine etkisi	69
<b>Şekil 22</b>	: Ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde içeriğine etkisi	71
<b>Şekil 23</b>	: <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem bitkisine ait farklı ekstraksiyon sürelerinde numunelerden elde edilen ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri	72
<b>Şekil 24</b>	: Ekstraksiyon süresinin, ekstraktların antioksidant aktiviteleri üzerine etkisi	73
<b>Şekil 25</b>	: Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (* <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem bitkisi için hekzan ekstraktlarında toplam fenolik madde tayini yapılamadı)	75
<b>Şekil 26</b>	: <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem bitkisine ait farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini temizleme yüzdeleri	77
<b>Şekil 27</b>	: Ekstraksiyon çözücüsünün, ekstraktların antioksidant aktiviteleri üzerine etkisi	77
<b>Şekil 28</b>	: <i>Laurocerasus officinalis</i> Roem. bitkisi için parçacık büyüklüğünün etkisi deneylerinden elde edilen toplam fenolik madde-antioksidant aktivite ilişkisi grafiği	79

<b>Ek Şekil 1</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar	97
<b>Ek Şekil 2</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LSCEY' ye ait kromatogramlar	98
<b>Ek Şekil 3</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LSOXY' ye ait kromatogramlar	98
<b>Ek Şekil 4</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LSCEK' ya ait kromatogramlar	100
<b>Ek Şekil 5</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LSOXK' ya ait kromatogramlar	101
<b>Ek Şekil 6</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LSCEG' ye ait kromatogramlar	102
<b>Ek Şekil 7</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LSOXG' ye ait kromatogramlar	103
<b>Ek Şekil 8</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LSCEY'ye ait kromatogramlar	104
<b>Ek Şekil 9</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LSOXY'ye ait kromatogramlar	105
<b>Ek Şekil 10</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de ekstraksiyon sonrasında LSCEK'ye ait kromatogramlar	106
<b>Ek Şekil 11</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LSOXK'ye ait kromatogramlar	107
<b>Ek Şekil 12</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LSCEG'ye ait kromatogramlar	108
<b>Ek Şekil 13</b>	: LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LSOXG'ye ait kromatogramlar	109

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Çizelge 1</b> : Bazı radikallere ait azalan elektron indirgeme potansiyelleri	10
<b>Çizelge 2</b> : Flavonoid altgrupları, kimyasal özellikleri, adları ve kaynağıyla bilinen gıda flavonoidleri	15
<b>Çizelge 3</b> : Bazı Besinlerin Antioksidan İçerikleri	19
<b>Çizelge 4</b> : Süperkritik akışkan olarak kullanılan bazı çözücüler ve özellikleri	27
<b>Çizelge 5</b> : Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	42
<b>Çizelge 6</b> : Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)	44
<b>Çizelge 7</b> : Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin IC <sub>50</sub> değerleri (µg/ml)	46
<b>Çizelge 8</b> : Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin FRAP değerleri (µM)	51
<b>Çizelge 9</b> : Her bir ekstraktın konsantrasyonu (C=mg/ml)	53
<b>Çizelge 10</b> : Geliştirilen LC-UV metodunun parametreleri	56
<b>Çizelge 11</b> : Ekstraktlarda gözlenen standartların ppm cinsinden Konsantrasyonları	58
<b>Çizelge 12</b> : 15 Fenolik standardın ekstraksiyonlarının % geri kazanımları	59
<b>Çizelge 13</b> : Seçimli ekstraksiyon sonrası fenolik standartların ppm cinsinden konsantrasyonları	63
<b>Çizelge 14</b> : Parça büyüklüğünün etkisi deneylerinde elde edilen ekstraksiyon verimleri (% , kuru orijinal numune üzerinden)	66
<b>Çizelge 15</b> : Parçacık büyüklüğünün toplam fenolik madde içeriğine etkisi deneylerinden elde edilen bulgular	67
<b>Çizelge 16</b> : Parça büyüklüğünün etkisi deneylerinde, ekstraktların DPPH radikal temizleme antioksidant aktivitesi deneylerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri	68
<b>Çizelge 17</b> : Ekstraksiyon süresinin etkisi deneylerinde elde edilen ekstraksiyon verimleri (% , kuru orijinal numune üzerinden)	70

<b>Çizelge 18</b>	: Ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde içeriğine etkisi (mg GAE/100 g kuru numune)	70
<b>Çizelge 19</b>	: Ekstraksiyon süresinin etkisi deneylerinde, ekstraktların DPPH radikal temizleme antioksidant aktivitesi deneylerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri	72
<b>Çizelge 20</b>	: Çözücünün etkisi deneylerinde elde edilen ekstraksiyon verimleri (% , kuru orijinal numune üzerinden)	74
<b>Çizelge 21</b>	: Çözücü etkisi deneylerinde elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)	75
<b>Çizelge 22</b>	: Çözücü etkisinin incelendiği deneylerde, ekstraktların DPPH radikal temizleme antioksidant aktivitesi testlerinden elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri	76



## 1. GİRİŞ

Canlı organizmanın serbest radikallerin etkisinden korunması için antioksidatif korunma sistemine sahip olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı, serbest radikallerin vücutta fazlaştığı görülür. Bu da vücutta bazı hasarlara neden olur, serbest radikallerin miktarı arttıkça önce yaşlanma hızlanır, hücre ölümü, sonra doku ölümü daha sonra ise beyin damarlarının tahribatına varan hasarlar oluşur [1].

Ham maddelerin işlenmesi ile ürünün saklanması sırasında oluşan lipit oksidasyon besinlerin acılaştırmasına neden olan ve böylelikle bozulmaya yol açan bir süreçtir. Lipit oksidasyon ürünleri besinlerin içerisinde bulunan protein gibi diğer maddelerin de absorpsiyonunu etkileyebilir. Okside olmuş lipitlerin organizma üzerine istenmeyen etkileri nedeniyle besinlerdeki lipit oksidasyon ürünlerini inhibe etmenin önemi daha da artmaktadır. Endüstriyel proseslerde besinlerin saklama süresini uzatmak için esas olarak sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak pek çok araştırmacı uzun süredir besin proseslemede kullanılan BHA ve BHT gibi bazı sentetik antioksidanların canlı organizmalarda karsinojenik etki gösterdiğine dikkat çekmektedirler. Tüketiciler de genellikle doğal antioksidanları sentetik olanlara tercih etmektedir. Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir. Bu nedenle uzun yıllardır besinlerin koku ve tad gibi özelliklerini arttırmak için katkı olarak kullanılan baharat ve aromatik bitkiler giderek önem kazanmaktadır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Antioksidanlar**

Antioksidan, oksit giderici her türlü kimyasal maddeye verilen addır, sadece biyolojik sistemlerde kullanılmazlar. Kimyasal işlemlerde ve endüstride kullanılan birçok farklı antioksidan vardır [2].

Antioksidan terimi (aynı zamanda anti-oksijen) esasında belirli bir şekilde moleküler oksijen tüketimini engelleyen kimyasal anlamına gelir. 19. ve 20. asırda, metallerin korozyonu, patlamalar ve kauçuk vulkanizasyonu gibi endüstriyel işlemlerde yer alan kapsamlı araştırmaların konusu antioksidanlardı [3].

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere de antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilmektedir [4].

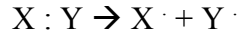
Canlı organizmanın serbest radikallerin etkisinden korunması için antioksidatif korunma sistemine sahip olduğu bilinmektedir [5].

### **2.2. Serbest Radikaller**

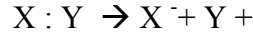
Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir [6]. Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda

hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir [7].

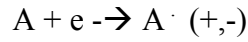
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar [6].

Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır [8]. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar.

*Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS);*

- süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ),
- hidroksil radikali ( $HO\cdot$ ),

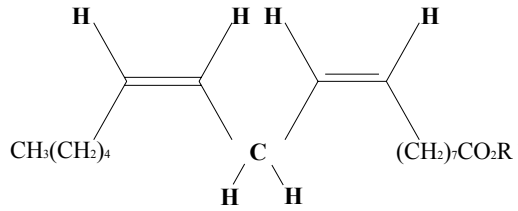
- nitrik oksit (NO),
- peroksil radikali (ROO<sup>•</sup>) ve
- radikal olmayan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar [9].

Serbest radikal zincir reaksiyonları genellikle, moleküllerden H'nın uzaklaştırılmasıyla başlar.

Lipid peroksidasyonu serbest radikal zincir reaksiyonu için iyi bir örnektir (doymamış yağ asitlerinin hücre membranlarında ve lipoproteinlerdeki oksidasyonu) [10].

### 2.2.1. Yağların Otoksidasyonuyla Oluşan Serbest Radikaller

Linoleik asit çoklu doymamış yağ asitlerine örnektir. Bu çeşit doymamış asitler doymamış yağlarda bulunan esterlerdir. Çoklu doymamış terimiyle bileşiğin iki veya daha fazla çift bağ içerdiği kastedilir.

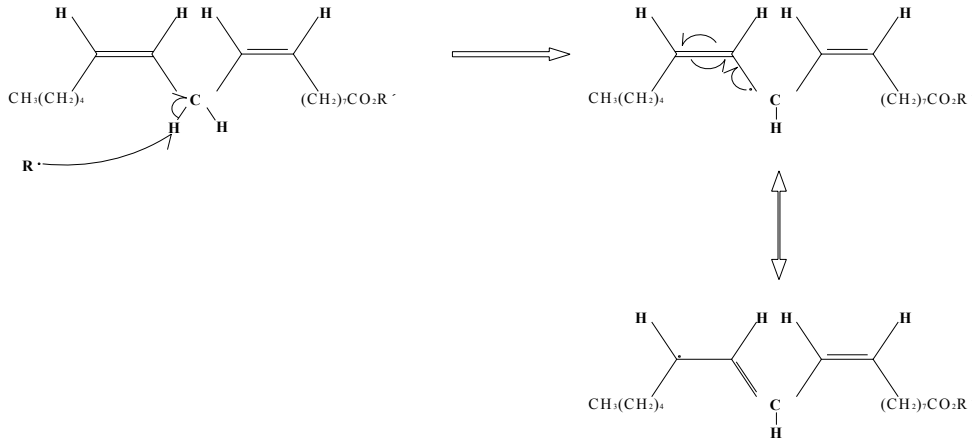


Linoleik Ester

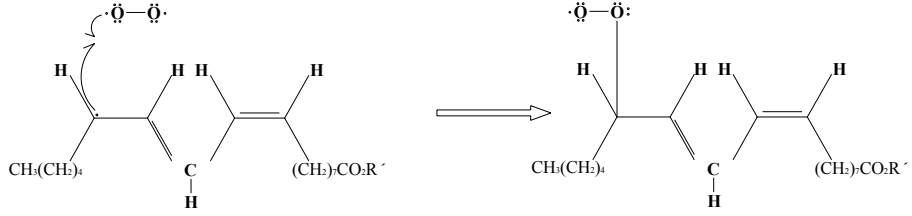
Çoklu doymamış yağlar kendi diyetlerimizde katı ve sıvı yağlarda bulunmaktadır. Aynı zamanda vücudumuzun tüm dokularında hayati fonksiyonlara sahiptirler.

-CH<sub>2</sub>- grubuna ait hidrojen atomları linoleik asidin iki çift bağı arasındadır (Lin-H) ve radikaller tarafından çıkarılmaya yatkındır. Bu hidrojenlerden birinin çıkarılması yeni bir radikal (Lin·) oluşturur. Oluşan radikalın (serbest radikalın) oksijenle zincir reaksiyonuna girmesi 'otooksidasyon' olarak adlandırılan genel bir reaksiyon tipidir. Otooksidasyon sonucunda hiperoksit formu oluşur. Otooksidasyon birçok maddede meydana gelen bir süreçtir: örneğin katı ve sıvı yağlar döküldüğü zaman bozulmanın ve acılaştırmanın artmasından, yağlı kumaşların açık havada aniden yanmasından sorumlu olan otooksidasyon sürecidir [11].

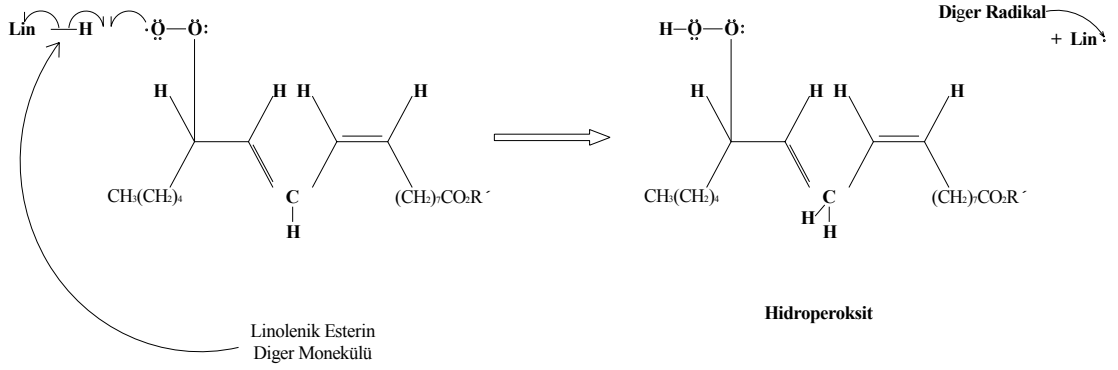
### 1. Basamak: Zincir Başlangıcı



## 2. Basamak: Zincir Büyümesi



## 3. Basamak: Zincir Büyümesi



Şekil 1. Linoleik asit esterinin otooksidasyonu [10].

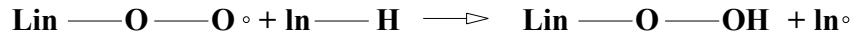
1. Basamakta iki çift bağ arasındaki  $-\text{CH}_2-$  grubunun hidrojen atomlarından birine bir radikalın saldırmasıyla reaksiyon başlatılır. Hidrojen çıkartılması rezonans hibrid olan bir radikal oluşturur.

2. Basamakta oluşan radikal iki zincir büyüme reaksiyonunun ilkinde oksijenle reaksiyona girerek oksijen içeren radikal oluşturur.

3. Basamakta peroksil radikali diğer bir linoleik ester molekülünden hidrojen çıkarır. Bu basamağın sonunda oluşan hiperoksit ve radikal (Lin) 2. basamağın tekrarlanmasına neden olabilir.

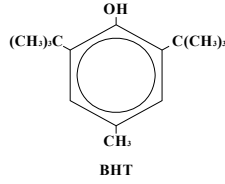
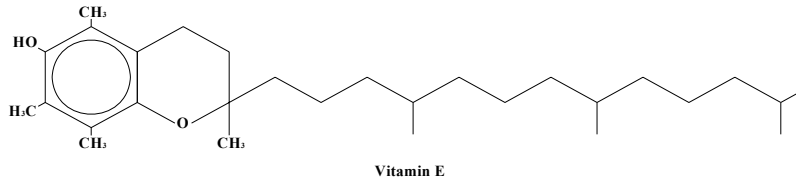
### 2.2.2. Otoksidasyonun Engellenmesi

Otoksidasyon vücutta da oluşmaktadır ve burada geri alınamaz zararlar meydana getirmektedirler. Peroksil radikalleriyle reaksiyona girip zincire devam etmeyen kararlı radikalleri oluşturan ve radikalleri hızlıca hapseden bileşiklerin varlığı durumunda otoksidasyon engellenir.



E Vitamini ( $\alpha$ -tokoferol) reaksiyondaki gibi radikal sonlandırıcıdır ve E vitamininin vücutta gerçekleştirdiği en önemli rollerden birisi de hücre yıkımına neden olabilecek radikal reaksiyonlarını engellemektir. BHT gibi sentetik bileşikler gıdalara eklenerek gıda otoksidasyonunu engellemektedir. BHT de radikal sonlandırıcı olarak bilinir [10].

Vitamin E'nin ( $\alpha$ -tokoferol) lipid peroksidasyonunu önlemesinin araştırılması antioksidanların bugünkü anlaşılabilirliğine öncülük yapmıştır. İndirgen ajan gibi davranan antioksidanlar reaktif oksijen türleri hücrelere zarar vermeden önce bu türleri genellikle süpürerek oksidatif zincir reaksiyonunu sonlandırır [12].



Şekil 2. E Vitaminine ve Bütillenmiş Hidroksi Toluene ait kimyasal yapılar [10].

### 2.2.3. Serbest Radikaller ve Serbest Oksijen Radikallerinin Patolojik Sonuçları

Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı, serbest radikallerin vücutta fazlaştığı görülür. Bu da vücutta bazı hasarlara neden olur, serbest radikallerin miktarı arttıkça önce yaşlanma hızlanır, hücre ölümü, sonra doku ölümü daha sonra ise beyin damarlarının tahribatına varan hasarlar oluşur [1].

- Serbest oksijen radikalleri birçok patolojik durum içermektedir [13].
- Serbest oksijen radikalleri kanser gelişiminin farklı aşamalarını açıkça içermektedir [14].
- LDL'nin (düşük yoğunlukta lipoprotein) oksidasyonunun ateroskleroz (damar tıkanıklığı) gelişiminde büyük rol oynadığı varsayılmaktadır [15].
- Serbest radikaller  $\beta$  hücrelerinin otoimmün yıkımında yer almakta ve diabete yol açmaktadır. Aynı zamanda insülin aktivitesini engellemektedir [16].
- Serbest radikallerce oksidasyona uğramış lens proteinleri katarakt oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır [17].
- Çok sayıda patolojik rahatsızlığın ilerlemesinde büyük rol oynayan serbest radikallerin oluşması, damar sertliği, beyin işlevsizliği ve kanser gibi hastalıklar ve ayrıca iltahaplı hastalıklar üzerine muhtelif etkilere sahiptir [18].



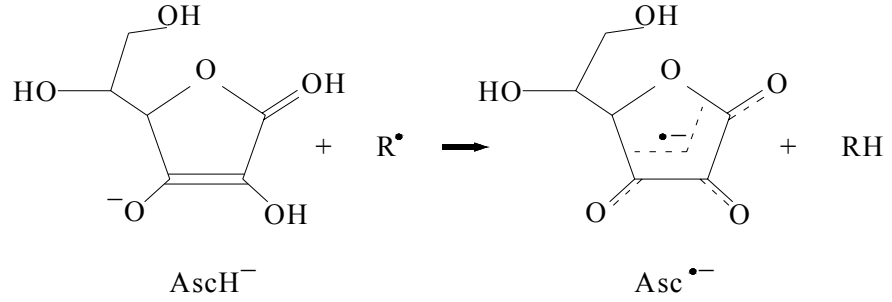
### 2.3. Antioksidanların Etki Mekanizması-Radikal Nötralizasyonu

Antioksidanlar çiftlenmemiş elektron durumunu ortadan kaldırmak için serbest radikallerden elektron alarak veya onlara elektron vererek serbest radikalleri nötralize eden moleküllerdir.

Tipik olarak bu serbest radikallerin radikal olmayan moleküle nötralizasyon işlemi esnasında antioksidan moleküllerinin serbest radikale dönüşmesi anlamına gelmektedir. Fakat radikale dönüşen antioksidan molekülü genellikle nötralize olmuş serbest radikalden daha az reaktiftir. Antioksidan molekülü çok büyük olabilmektedir ( bir anlamda çiftlenmemiş elektronları seyreltmesini sağlar), başka bir antioksidan tarafından kolayca nötralize olmuş olabilir ve/veya kendi serbest radikal durumunu yok etmek için kendinde başka bir mekanizmaya sahip olabilir [19].

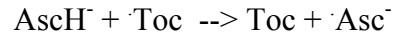
Zayıf bağlı hidrojen atomlarına sahip moleküller serbest radikalleri nötralize etmek için bu hidrojen atomlarını elektron gibi kullanabilmektedirler. Hidrojen atomları indirgeme eşdeğerleri diye adlandırılırlar ve bu hidrojenlere sahip moleküller indirgenmiş düzeydedirler.

Örneğin; C vitamini (askorbat, AscH<sup>•</sup>), hidrojen atomunu serbest radikal moleküle (R<sup>•</sup>) verebilir böylece kendisi askorbat radikali ( farklı gösterimlerde  $\dot{A}sc^{\cdot}$ , veya Asc<sup>•</sup>) olurken serbest radikali nötralize eder. Fakat  $\dot{A}sc^{\cdot}$  serbest radikali rezonans yapısından ( şekilde kesikli çizgilerle gösterilmiştir) dolayı çok kararlıdır.



Şekil 3. Askorbat radikalinin oluşumu [19].

C vitamini hidrojen vererek sadece hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), alkoksil ( $\cdot\text{OL}$ ) ve peroksil ( $\text{LOO}\cdot$ ) radikallerini nötralize etmez aynı zamanda glutatyon ( $\cdot\text{GS}$ ) ve E vitamini (tokoferol) ( $\cdot\text{Toc}$ ) gibi diğer antioksidanların radikal formlarını da nötralize eder.



Çizelge 1. Bazı radikallere ait azalan elektron indirgeme potansiyelleri [19].

Radikal İndirgeme Potansiyelleri	
Radikal	mV
$\cdot\text{OH}$ (hidroksil)	+2300
$\cdot\text{LO}$ (alkoksil)	+1600
$\text{LOO}\cdot$ (peroksil)	+1000
$\cdot\text{GS}$ (glutatyon)	+920
$\cdot\text{HU}$ (ürat)	+590
$\cdot\text{Toc}$ (tokoferol)	+480
$\cdot\text{Asc}^-$ (askorbat)	+282
$\text{Fe}^{3+}$ -EDTA	+120

Serbest radikaller pH 7,0'de miliVolt biriminde bir elektron indirgeme potansiyelleriyle listelenmiştir. Her radikalın indirgenmiş formu daha yüksek potansiyele sahip serbest radikali nötralize etme gücüne sahiptir. Tablodan da görüldüğü üzere hidroksil radikali (OH) en yüksek potansiyele sahiptir ve biyolojik radikaller içinde en yıkıcı (reaktif) radikaldir [19].

## **2.4. Gıda Endüstrisinde Antioksidanlar (Gıda Koruyucuları)**

### **2.4.1. Gıdalarda Oksidatif Bozunma ile Serbest Radikal Oluşumu ve Oluşan Olumsuz Etkilerinin Giderilmesi:**

Gıda endüstrisinin uzun zaman gıda maddelerinin bayatlaması ve oksidatif bozulması gibi konularla ilgili olduğu dönemde, oksidatif stres çok sayıda hastalıkla ilişkilendirilmiştir.

- Saklama ve işlem süresince yağların otooksidasyonu kadar enzimatik oksidasyon da gıdaların yumuşaklık ve besinsel değerini, tadını, rengini etkileyen gıda kalitesindeki kötüleşmeden sorumlu önemi büyük olan reaksiyondur.
- Serbest radikal yok etme basamağına yönelmesi ve oksidasyon basamağını geciktirmesi amacı ile reaksiyonun başlama ve çoğalma basamaklarını inhibe etme yoluyla oksidasyonun radikal zincir reaksiyonlarının engellemesi için gıdalara çoğunlukla antioksidanlar eklenmektedir [20].
- Antioksidanlar, yağ peroksidasyonunda aşağıdaki mekanizmalarca etki eder:
  - (i) lokalize olmuş oksijen konsantrasyonlarını azaltır,
  - (ii) yok edici başlangıç radikalleriyle zincir başlangıcını önler,

- (iii) başlatıcı radikal üretiminin engellenmesi için metal iyonları gibi katalistleri bağlar;
- (iv) tekrar başlatıcı radikallere dönüşmemesi için peroksit yapılarını bozar; ve
- (v) aktif radikaller tarafından devamlı hidrojen soyutlanmasının engellenmesi amacıyla zincir-kırma reaksiyonunu gerçekleştirir [21].

- Bununla birlikte, bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT) gibi sentetik antioksidanlar kanunen sınırlandırılmıştır çünkü toksik etkiye sahip oldukları ve olası karsinojenler olduğu sanılmaktadırlar.
- Bu yüzden, endüstri tarafından artan ilgi, sentetik bileşikler yerine doğal bileşikler için tüketici tercihlerindeki eğilimin gelişmesi ve gıda uygulamalarında sentetik antioksidanların elenmesi antioksidanların doğal kaynağını bulmaya daha fazla hız katmıştır.
- Böylelikle, hem gıda bilimcileri hem de sağlık profesyonelleri için antioksidanlar ilgi kaynağı olmuştur.
- Ayrıca beslenmede antioksidanların rolü gibi alanlarda araştırmacıların ilgileri ortak bir noktaya varmış ve insan sağlığına olan etkileri de dikkate alınmıştır.
- Epidemiyolojik çalışmalar, kanser, diabet, Alzheimer hastalığı ve kardiyovasküler gibi ciddi biçimleri içeren çeşitli hastalıklara karşı korunmanın sebze ve meyve tüketimi artışı ile ilişkili olduğunu göstermiştir [20].

## 2.5. Doğal Antioksidanların Yapıları ve Kaynağı

Tokoferoller, askorbik asit, flavonoidler ve fenolik asitler en önemli doğal antioksidan gruplarıdır [22-24]

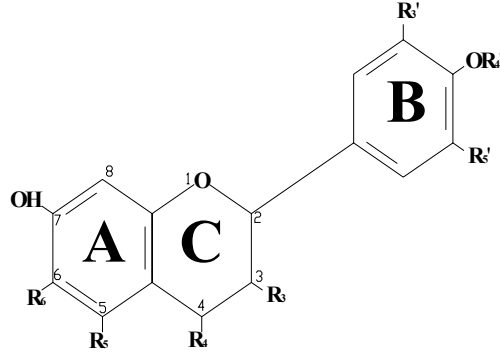
### 2.5.1. Tokoferoller

En iyi bilinen ve en geniş kapsamlı kullanılan antioksidanlardır. Tokoferoller ve tokotrienoller olmak üzere iki gruba ayrılırlar ve her iki grup için dört izomer ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ -) vardır. Böylelikle toplam sekiz tokoferol izomeri bulunmaktadır. Hemen hemen tüm gıdalarda eser miktarda dahi olsa bulunurlar.

Bu gruptaki en önemli antioksidan E vitamininin en aktif formu olan  $\alpha$ -tokoferoldür [25]. Tokoferoller, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline vererek antioksidatif aktivite göstermektedirler.  $\alpha$ -Tokoferolün aynı zamanda hidroperoksitlerin dekompozisyonunu yavaşlattıkları bilinmektedir. Tokoferoller ısıya karşı oldukça dayanıklıdırlar.  $\alpha$ -Tokoferolün oksidatif stabiliteyi artırmada ve sıcaklık arttıkça oksidasyon hızını azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir [22].

### 2.5.2. Flavonoidler

Genellikle bitkilerde bulunan ve günlük diyetle sıklıkla tüketilen difenilpropanlardır.



Şekil 4. Flavonoidlere ait genel kimyasal yapı [26].

Flavonoidler alt gruplarına ayrılırken B halkasından C halkasına olan bağın pozisyonu ve aynı zamanda C halkasına ait fonksiyonel grupların oksidasyon durumu dikkate alınmaktadır. Aynı zamanda flavonoidler polifenollerin alt grubudur.

Çizelge 2. Flavonoid altgrupları, kimyasal özellikleri, adları ve kaynağıyla bilinen gıda flavonoidleri [26].

Flavonoid alt grupları	B halkasının C halkasına olan bağının pozisyonu	C halkasının doymamışlık derecesi	C halkasının fonksiyonel grupları	Bilinen besin flavonoidleri	Zengin besin kaynakları
Flavanol	2	Yok	3- hidroksi 3-O-gallat	Katekin Gallokatekin Epikatekin Epigallokatekin Epikatekin-3-gallat Epigallokatekin-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 örn; maydanoz
İzoflavonlar	3	2-3 çift bağ	4-okso	Daidzein Genistein Glisitein Biokanin A Formonentin	soya fasulyesi, soya
Flavonollar	2	2-3 çift bağ	3-hidroksi, 4-okso	İsorhamnetin Kaempferol Myricetin Quercetin	Hemen hemen tüm gıdalarda
Antosiyanidinler	2	1-2, 3-4 çift bağ	3-hidroksi	Cyanidin Delphinidin Malvidin Pelargonidin Petunidin Peonidin	Kırmızı, mor ve mavi çilek, kiraz

Gıdalardaki flavonoidler ya bitkiler tarafından ya da gıdasal işlemler sonucunda büyük moleküllere polimerize olurlar. Bu polimerlere tannin adı verilir. Tanninler enzimatik ve atmosferik koşullarda oluşmaktadır. Siyah çay, kırmızı şarap ve kahve gıdasal işlemler sürecinden geçtikten sonra tanninleri oluşturmaktadır [26]

En önemli flavanoid kaynakları sebzeler, meyveler ve içeceklerdir [25]. Flavonoidler, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> karbon iskeleti ile karakterize edilmektedirler. İki aromatik halka, üç karbonlu bir alifatik zincir ile birbirine bağlanmaktadır.

Flavon, flavonol, izoflavon, flavonon ve çalkonları içeren flavonoidler tüm bitki dokularında bulunmaktadır [22]. Flavonoidler, antioksidatif aktivitelerini ksantin oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksjenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek, ve süperoksit anyonları, lipid peroksil radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak göstermektedirler [25, 27].

### **2.5.3. Fenolik asitler**

p-Hidroksibenzoik, 3,4-dihidroksibenzoik, vanillik, syringic, p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik, klorojenik ve rosmarinik asit gibi fenolik asitlere bitkiler aleminde sıklıkla rastlanmaktadır.

Organik asit esterleri veya glikozitler olarak bulunmaktadır. Pozisyon ve hidroksilasyon derecesi antioksidatif aktiviteyi belirlemede öncelik taşımaktadır [22,28].



#### **2.5.4. Askorbik asit**

C vitamininin meyvelerde bulunan en baskın formudur. Birincil oksidasyon ürünü olan L-Dehidroksiaskorbik asit (DHA) de biyolojik aktiviteye sahip olduğu için önemlidir. Meyvelerdeki ortalama DHA miktarı, toplam C vitamini içeriğinin %10'undan azdır. Okside olmuş olan form dekompozisyona daha dayanıksız olduğu ve biyolojik aktivite kaybına yol açtığı için, askorbik asit formlarındaki değişiklikler hem teknolojik hem de besinsel açıdan önemlidir [29].

#### **2.5.5. Karotenoidler**

Bitkilerde ve hayvansal dokularda bulunan kırmızı-sarı pigmentlerdir. Gıdalarda bulunan karotenoidler, sekiz tane beş karbonlu izoprenoid biriminin biraraya gelmesiyle oluşan 40 C'lu polienlerdir. Doğada 670'ten fazla karotenoid bulunmakta ve bunların çoğu antioksidatif aktivite göstermektedir.

Gıdalarda bulunan en önemli karotenoidler  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, likopen, lutein ve  $\beta$ -kriptoksantindir.  $\beta$ -Karoten, vücutta A vitaminine dönüştürülmektedir. Sarı-turuncu renkli meyve ve sebzeler, koyu yeşil renkli sebzeler karotenoid kaynağı gıdalar olarak gösterilmektedir [30].

### **2.5.6. Antioksidan enzimler “serbest radikalleri yakalayan enzimler”**

**(superoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz)**

Gıdalarda bulunan bazı enzimler oksijeni uzaklaştırarak, hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri gibi aktif oksijen türlerini uzaklaştırarak veya lipid hidroperoksitlerini azaltarak antioksidatif aktivite gösterebilmektedirler. Superoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz bu gruba giren enzimler arasındadırlar [31].

### **2.6. Gıdalarda Bulunan Antioksidanlar**

Serbest radikal yok edicileri gibi davranan, meyve ve sebzeler; insan sağlığı için gerekli olan antioksidan vitaminlerinin (vitamin E, vitamin C, vitamin A'nın öncüsü olan örn;  $\beta$ -karoten) en önemli kaynağıdır [20].

Bununla birlikte meyve ve sebzelerdeki toplam antioksidan kapasitesinin %80'inden fazlası antioksidan vitaminlerinin dışında kendi içeriklerinde bulunanlardan dolayı gelmektedir ki bu da bu gıdalarda bulunan diğer önemli antioksidanların varlığını göstermektedir ayrıca serbest radikaller üzerinde yok edici verimliliğini gösteren dominant antioksidanlar fenolik bileşiklerdir ve bitki aleminde reaktif oksijen türleri çok sayıda ve geniş çapta bulunmaktadır [20].

Çizelge 3. Bazı Besinlerin Antioksidan İçerikleri [22,24,32]

Besinler	Antioksidan bileşikler
Patates	Askorbik asit, $\alpha$ -tokoferol ve polifenolik bileşikler (Mor patates ve kabuğu, beyaz ve sarı patates türlerine oranla daha yüksek antioksidatif aktivite göstermektedir.)
Brokoli ( <i>Brassica olearacea</i> L. cv Italica L.), Brüksel lahanası( <i>B. olearacea</i> L. Gemmifera), Kırmızı lahanası ( <i>B. olearacea</i> L. cv Rubra), Beyaz lahanası ( <i>B. olear-acea</i> L. cv Alba) ve Karnabahar ( <i>B. olearacea</i> L. cv Botrytis)	Flavanoller ve hidroksisinnamik asit gibi fenolik bileşikler
İspanak	Fenoller
Domates ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Likopen ve fenolik maddeler
Nektarin ( <i>Prunus persica</i> var. nucipersica), Şeftali ( <i>Prunus persica</i> L.), Erik ( <i>Prunus avium</i> L.) ve Vişne ( <i>Prunus cerasus</i> L.) ve Kiraz	Yüksek oranda askorbik asit bulunmakla birlikte kabuğu fenolik maddeler açısından da zengindir
Turunçgil meyveleri	Askorbik asit ve flavonoid içerikleri
Elma	Polifenoller (epikateşin, guersetin glikozit, klorojenik asit, ploridzin ve 3-hidroksi-ploridzin), beta-karoten
Siyah renkli üzümler	Yüksek oranda flavonoid ve hidroksisinnamatlar

## 2.7. Fenolik Antioksidan Bileşikler

Fenolik bileşikler meyvelerde, sebzelerde, kabuklu yemişlerde, çiçeklerde, çekirdeklerde ve bitkilerde doğal olarak bulunmakta ve bu maddelere renk, acılık, kekrelik gibi duyuşsal özellikleri sağlamaktadır [33].

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar [34-37]. Fenolik bileşiklerin numune matrisinden izolasyonu uygulanacak her kapsamlı yöntem için önceden belirlenmesi zorunlu bir durumdur. Sonradan ortaya çıkan ölçüm basamakları için seçiciliği arttırmak numune kullanımındaki ihtiyacı aza indirebilir. En büyük amaç numune ekstraktının hazırlanışının matris engellemelerinden bağımsız olması ve ilgilenilen tüm bileşenler için aynı derecede zenginleştirilmiş olmasıdır. Geri kazanım görevi birçok gıda ve bitkinin enzim aktivitesine sahip olması nedeniyle daha çok komplike bir durumdur bu yüzden

doğru ekstraksiyon yapmayı sağlayabilmek için son derece dikkatli olunmalıdır [38]. Ekstraksiyon suresince insan hatası sonucunda oluşan hidroliz, oksidasyon ve izomerizasyon için dikkat edilmelidir [39-41].

Bileşikleri bu tur bozunmalardan korumanın metodu antioksidan ( bileşiğin kendinden daha ‘aktif’ olduğu duşnlen antioksidan) ilavesini, ekstraksiyon suresince ışıksız ve inert atmosfer ortamı kullanılmasını içermektedir [42]. Bunun gibi ifadeler numune hazırlamanın ciddi onemini vurgulamaktadır. Ayrıca yuksek performanslı sıvı kromatografi sistemini bulan Merken ve Beecher [43] tarafından flavonoidlerin beş alt sınıfından; flavonlar, flavanoller, katekinler ve antosiyanidinlerin herbirinden ayrılan buyk yapılı fenolikler gösterilmiştir.

Sınırlı aralıkta fenoliklerin uygun referans bileşiği olarak ticari elde edilebilirliği fenolik bileşiklerin miktar ölçümüne ilgiyi azaltmıştır [44]. Ancak bu durum hızla değişmektedir ve fenol miktarlarının ölçümüne olan ihtiyaç arttırılmaktadır.

Artık bitki fenollerinin konsantrasyon aralığı fenol çeşitliliğine ve sayısına göre farklılıklar göstermektedir.Bitki fenolleri genellikle  $pK_a$  değerlerinin 8’den 12’e değişen aralıklarda olmasıyla iyonlaşabilme özelliğine sahiptir ve yağ:su ayrılma katsayıları  $6 \times 10^{-4}$ ’den 1,5’a değişmektedir [45]. Bundan dolayı fenolikler asiditede hatırı sayılır farklılık gösterirken polaritesinde de hidrofobik karakterden hidrofilik karaktere değişkenlik göstermektedir.

Yeni fitokimyasallar aynı zamanda geleneksel ilaçlarda da görülmektedir ve bitkinin kök, iek, yaprakları gibi ‘yenilemeyen’ kısımlarında da fitokimyasallar bulunmaktadır [46-49]. Diyetle alınan en önemli fenoller (kantitatif olarak) fenolik asitler ve flavonoidlerdir [50].

Tahıllardaki fenolik içerik çoğunlukla dış tabakada bulunduğu için öğütme derecesi fenolik içerik üzerinde önemli etkilere neden olmaktadır [51].

Polen [52, 53], yulaf tanesi [54], meyve ve sebze [42], zeytin yağı [55], soğan ve soya tohumu ekstraktı [56] ve bitki gibi çeşitli numune tiplerinden geniş bir aralık içinde yer alan fenoliklerin geri kazanımı için çoğu kez seçilen çözücü etil asetat ve sulu metanoldür.

Fenolik maddeler bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşiklerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir. Bu bileşikler genellikle bitkilerde glikozit ve ester formlarında bulunmaktadır [18].

Her ne kadar koruyucu etkilerin ilk zamanlarda  $\beta$ -karoten ve askorbat gibi gıda içerikleriyle ilişkili olduğu düşünülmüşse de fenolik unsurlar önemli derecede rol oynayabilmektedirler [33].

Eğer elektron verici grup varsa, özellikle de fenolik bileşiklerin o- ve p-konumlarında bulunan hidroksil grubu bileşiği polar yapar ve bundan dolayı antioksidan aktivite artar. Aynı zamanda, birçok *Salvia* türünün en önemlisi olan 'rosmanol'ün bu kadar güçlü antioksidan aktivitesinin olmasının en önemli nedeni de budur, çünkü bu gruplar fenollerini kolaylıkla hidrojen atomlarını verebilecek duruma getirerek, serbest radikalleri etkili hale getirir ki bu da otooksidasyon zincir reaksiyonunu durdurur. Bu görüş, raporlarıyla Gu ve Weng tarafından da desteklenmektedir [21].

Bitki polifenollerinin antimikrobiyal ajanlar olduğu düşünülmektedir ve potansiyel doğal gıda koruyucuları olarak önerilmektedirler. Fenolik bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi geçmişte rapor edilmiş olmasına rağmen, mikroorganizmalar üzerine etki mekanizması henüz açıklanmamıştır [37].

### **2.7.1. Fenollerin İzolasyonu ve Antioksidan Kapasitelerinin Ölçümü**

Açık havada kurutulmuş ve iyice öğütülmüş bitkilerin ekstraksiyon işlemine tabi tutulmasıyla fenolik yapılar daha çok suda çözünebilir (polar) çözücü kısmında kalmaktadır (örn; metanol, etanol, su).

Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen ekstraktlar, DPPH serbest radikal süpürücü uygulaması ve  $\beta$ -karoten/linoleik asit sistemi diye adlandırılan iki tamamlayıcı test sistemi tarafından antioksidan aktivitesi olasılıkları için araştırılır.

DPPH radikal yok-edici uygulaması kaba ekstraktın hidrojen verme kapasitesini tayin edebilmek için Von Gadow, Joubert ve Hansmann [57] tarafından tanımlanan metodun kullanılmasıyla yapılır.  $\beta$ -Karoten/linoleik asit sisteminde uçucu organik bileşiklerine ait ve linoleik asit oksidasyonundan doğan çiftleştirilmiş hiperoksit dienlerine ait şiddet azalmasının ölçülmesi ile antioksidan kapasitesi tespit edilir [18].

### **2.7.2. Fenolik Bileşiklerin Analiz Yöntemleri**

Karmaşık yapılarından dolayı fenolik bileşiklerin, ölçümü ve bitki materyallerinden izolasyonu çok zordur.

Şüphesiz, aromatik bitkiler içinde fenolleri hem nicel hem de nitel olarak tespit edebilmek çok önemlidir. Bu bileşiklerin tayini ve ayrımı için birçok analitik metod kullanılmıştır. Bu denenmiş metodların çoğu yüksek performans sıvı kromatografisi tekniği ile UV spektrometresini baz almıştır çünkü bu metotta türevlendirme analizlerin öncesinde gerekmemektedir. Yine de kütle spektrometrisi (MS) ile karşılaştırılınca UV-görünür bölge spektrumu yeterli derecede ayırma gücüne sahip değildir. Bundan dolayı kütle spektrometrisi (MS) ile birleştirilmiş kapiler gaz

kromatografisi (GC-MS) daha kesin sonuçlar çıkarabilmektedir. GC-MS ile analizi yapılan uçucu olmayan ve ısıya karşı dayanıksız fenoliklerin, kimyasal türevlendirmeye uçucu ve ısıya dayanıklı maddelere çevrilmesi gerekir.

Son zamanlarda LC-MS de geniş çapta kullanılmıştır. Sıvı kromatografisi tekniği ile kütle spektrometrisi tekniği gibi birleştirilmiş tekniklerin kullanılması bitki ekstraktlarının analizinde önemli avantajlar sağlamaktadır çünkü LC'nin ayırma özelliği ile MS'in tespit ve ispat gücü birleşmektedir.

HPLC analizinde ise, önce glikozidler ve esterlerin hidroliz olması gerekli olan bir aşama vardır; böylelikle fenolik içerikler tayin edilebilirler.

Ekstraksiyon % 62.5 sulu metanol karışımında yapılmaktadır. Metanolün koruyucu özelliği, fenolik bileşiklerin ezimler tarafından oksidasyona uğramasını önler.

Fenolikleri ayırmak için uygulanan HPLC tekniğinde ters faz (RP) kolonlar kullanılır. Fenolik maddelerin ölçümü ve izolasyonu için kullanılan bu teknik çok yaygındır. Alıkonma sürelerinin ve spektral eşleşmenin baz alınmasıyla her bileşiğin analizi yapılmış olur. Örneğin; Literatürlere göre benzoik asit türevleri 246-262 nm'de maksimum absorpsiyon göstermektedir [37].

## **2.8. Antioksidan Madde Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler**

Bu teknikler, sıvı çözücü ekstraksiyonları, katı faz ekstraksiyonları ve süperkritik akışkan ekstraksiyonları olmak üzere üç ana kısımda ele alınabilirler [50].

### **2.8.1. Sıvı Çözücü Ekstraksiyonları**

Çoğu durumda, geniş sayıda fenollerin geri kazanımında basit süzme işleminin yetersiz kalmasıyla sıvı ekstraksiyonuna başvurulur. Bu yöntemde, pek çok farklı özellikteki numuneden fenollerin geri kazanımı amacıyla, etil asetat ve sulu metanol en çok tercih edilen çözücüler olmuştur. Bunların yanı sıra daha az oranda olsa da metanol, etanol, sulu etanol, sulu aseton ekstraksiyonları da uygulanmaktadır [50].

### **2.8.2. Katı-Faz Ekstraksiyonları**

Bir numunedeki fenollerin dedektör duyarlılığı ve seviyelerindeki değişim, sıklıkla farklı geri kazanım teknikleri gerektirebilir. Örneğin flavonon glikozitler kan portakalı suyundan basit ekstraksiyonla geri kazanılabiliyorken, trans-sinamik asit ters-faz katı faz ekstraksiyonuyla konsantre edilebilmiştir. Katı-faz ekstraksiyonları, pek çok sıkıcı ve yorucu geleneksel ekstraksiyon metodlarına göre daha hızlı ve daha duyarlı bir tekniktir. Katı faz ekstraksiyonu yoluyla numune hazırlama ve konsantrasyonu tek bir basamakta gerçekleştirilebilir. Bu teknikte de yıkama çözücülerini olarak etil asetat, metanol, tetrahidrofur, asetonitril, metanol-dimetilsülfoksit karışımı gibi çözücü sistemleri kullanılmaktadır. C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>18</sub>-ters-faz, iyon değiştirici, poliamid gibi ekstraksiyon kartuşları da en fazla tercih edilen katı fazlardır [50, 58, 59].



### 2.8.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Pek çok alanda olduğu gibi, fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda da süperkritik akışkanlardan yararlanılmaktadır. Süperkritik akışkanların kullanışlı özellikleri ve tekniğin uygulamasındaki kolaylıklar son yıllarda bu tekniğe olan ilgiyi artırmıştır.

#### 2.8.3.1. Süperkritik Akışkanlar ve Özellikleri

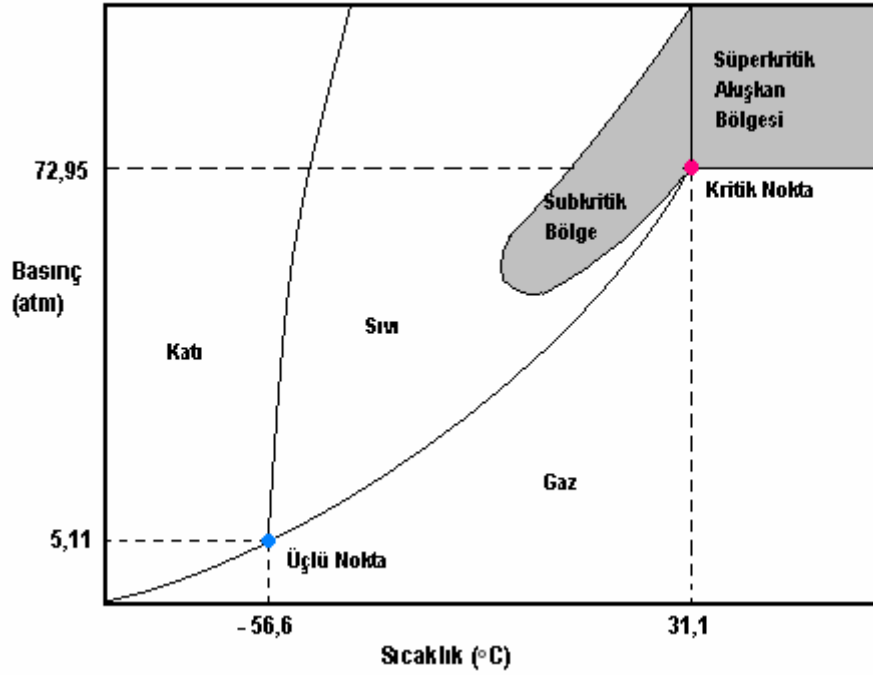
Bir süperkritik akışkan, “sıcaklığı ve basıncı kendi kritik sıcaklığı ve basıncının üstünde olan, gaz benzeyen, içinde bulunduğu kabı doldurup onun şeklini alabilen ve sıkıştırılabilen bir akışkan” olarak tanımlanmaktadır. Süperkritik akışkan bir sıvı değildir fakat sıvıya benzer bir yoğunluğa (0,1-1 g/ml) ve çözücü gücüne sahiptir [60].

Kritik sıcaklık, bu sıcaklığın yukarısında bir gazın basıncını yükseltmek suretiyle sıvılaştırılmasının mümkün olmadığı sıcaklıktır. Kritik basınç ise, kritik sıcaklıktaki bir gazın sıvılaştırabilmesi için gerekli olan basınçtır [60]. Bir basınç-sıcaklık diyagramında, kritik sıcaklık ve kritik basınç noktalarından diğer eksene çizilen yatayların kesim noktasının (kritik nokta) ötesinde kalan bölge “süperkritik akışkan” bölgesi olarak adlandırılır (Şekil 5).

Bu bölgede madde hem sıvı hem de gaz özelliklerini beraberinde taşır. Bu nedenle bu bölgedeki madde ne sıvı ne de gaz olarak kabul edilir. Sadece “akışkan” olarak adlandırılır.

Ekstraksiyonda süperkritik akışkan kullanılmasının klasik çözücü kullanımına göre bazı avantajları vardır. Örneğin, süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon hızlıdır. Sahip oldukları düşük viskozite onlara, sıvılara nazaran daha iyi bir kütle transferi karakteristiği sağlar. Kantitatif bir süperkritik akışkan ekstraksiyonu genellikle 10-60

dk'da tamamlanıyorken, sıvı ekstraksiyon süreleri birkaç saatten birkaç güne kadar değişebilmektedir. Ayrıca, süperkritik akışkanlar oda sıcaklığında çoğunlukla gaz olduklarından dolayı, sıvı ekstraksiyonlarında ekstraksiyondan sonra uygulanması gereken konsantrasyon basamağı ortadan kalkar veya daha basit bir hale gelir.



Şekil 5. CO<sub>2</sub>'in faz diyagramı

Süperkritik akışkanların çoğu inert, saf, toksik olmayan ve ucuza temin edilebilecek maddelerdirler. CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub>O gibi maddeler çok düşük bir kritik sıcaklığa sahip olduklarından (31°C ve 36 °C) sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstraksiyonunda da kullanışlıdır [61]. Bir süperkritik akışkanın çözücü kuvveti ekstraksiyonun gerçekleştirildiği sıcaklığa ve basınca bağlıdır. Bu durum basıncın (daha dar bir kapsamda sıcaklığın) değiştirilmesiyle ekstraksiyonun özel bir bileşik sınıfı için optimize edilmesine imkan tanır. Örnek olarak antioksidan aktif bileşikler olan karnosik asit, karnosol, epirozmanol ve izorozmanol'un biberiye yapraklarından iki basamaklı ekstraksiyonu örnek olarak verilebilir. Bu şekilde farklı antioksidan

aktiviteli ve esansiyel yağ bileşenli iki fraksiyon elde edilebilmiştir. Bu ekstraksiyonun ilk basamağı 40 °C ve 100 bar basınçta, ikinci basamağı ise 60 °C ve 400 bar basınçta gerçekleştirilmiştir [62]. Sıvı-katı ekstraksiyonlarında genellikle 20-100 g'lık numune miktarları ile çalışılıyorken, süperkritik akışkan ekstraksiyonunda genelde 0,5-0,15 g gibi çok küçük miktarlarla çalışılabilmektedir [63]. Tipik bir sıvı-katı ekstraksiyonu yüzlerce ml çözücü gerektirir. Oysa süperkritik akışkan ekstraksiyonunda bir kaç ml organik çözücü ya kullanılır ya da hiç kullanılmaz [64].

Süperkritik akışkan ekstraksiyonlarında kullanılan çözücülerin sayısı oldukça sınırlıdır. Bu amaçla kullanılan çözücülerden bazıları ve özellikleri Tablo 1'de verilmiştir [65].

Çizelge 4. Süperkritik akışkan olarak kullanılan bazı çözücüler ve özellikleri

Akışkan	Kritik Sıcaklık (°C)	Kritik Basınç (atm)	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Kritik Hacim (cm <sup>3</sup> /mol)	Dipol Moment (debye)	Kritik Yoğunluk (g/ml)
Metan (CH <sub>4</sub> )	-82,4	46,6	16,4	99,2	0,0	0,160
Etan (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> )	32,4	49,5	30,07	148,3	0,0	0,204
Propan (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> )	96,8	43,1	44,09	203,0	0,0	0,219
n-Bütan (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> )	155,2	38,5	58,12	255,0	0,0	0,225
n-Pentan (C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> )	196,6	34,1	72,15	304,0	0,0	0,230
n-Hekzan (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> )	234,4	30,5	86,18	370,0	0,0	0,230
Aseton (CH <sub>3</sub> -CO-CH <sub>3</sub> )	235,1	47,6	58,08	209,0	2,9	0,242
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	240,1	82,0	32,04	118,0	1,7	0,246
Etanol (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	243,2	62,2	46,07	167,1	1,7	0,275
Karbon dioksit (CO <sub>2</sub> )	31,1	74,8	44,01	93,9	0,0	0,472
Amonyak (NH <sub>3</sub> )	132,4	115,0	17,03	72,5	1,5	0,211
Nitroz oksit (N <sub>2</sub> O)	36,6	73,4	44,01	97,4	0,2	0,445
Su (H <sub>2</sub> O)	374,4	224,1	18,02	57,1	1,8	0,281
Kloroform (CHCl <sub>3</sub> )	263,4	54,4	119,38	238,9	1,1	0,525
Benzen (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	562,2	49,5	78,11	259	0,0	0,298
Sikloheksan (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> )	560,5	43,9	82,15	-	0,6	0,265

Süperkritik akışkan ekstraksiyonlarında kullanılan çözücüye değişik oranlarda farklı polaritede başka çözücüler ilave edilerek ekstraksiyon işlemlerinde seçicilik oluşturulabilmektedir. İlave edilen çözücü genellikle “modifiyer” olarak adlandırılır. Küçük bir miktar modifiyer ilavesi ekstraksiyon etkinliğini artırabilir. Bir çalışmada, aromatik bitkilerden esansiyel yağları ekstrakte etmek için 2,5 ml'lik bir süperkritik

akışkan hücrelerinde 500 mg'lık bir numuneye sadece 0,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ilave etmek suretiyle, 4 saatlik bir hidrodistilasyondan elde edilen verim 90 dk yerine 30 dk'da elde edilebilmiştir [66].

### **2.8.3.2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun fenolik bileşiklere uygulanması**

Yüksek basınçlı sistemlerin laboratuvarlarda kullanılabilir hale gelmesiyle birlikte süperkritik akışkan ekstraksiyonu, esansiyel yağlar, diğer koku ve tat verici bileşikler, tıbbi bileşikler, yağlar, karotenler ve alkaloidler gibi polar olmayan çeşitli bileşik gruplarına uygulanır hale gelmiştir [67]. Bununla beraber uzun ekstraksiyon sürelerine sahip olmaları ve son derece reaktif fenolik türlerin bozunma sürecinden korunması amacıyla önlem gerektirmelerinden dolayı geleneksel metotların katı ve yarı katı numunelere uygulanmaları sınırlı kalmaktadır. Bu sebeplerden dolayı süperkritik akışkan ekstraksiyonu, fenolik bileşiklerin ekstraksiyon davranışı ve geri kazanımı için çok sayıda avantaj sunmaktadır [68]. Yapılan bir çalışmada, geniş bir polarite aralığında fenolik bileşikler seçildi. Ekstraksiyon parametreleri optimize edildiğinde en uygun düzenleyicinin (modifiyer) metanol olduğu tespit edildi. Sabit katı silisyum oksit fazından sadece p-kumarik asit, ter-resveratrol ve salisilik asit gibi daha az hidroksilasyonlu bileşikler kantitatif olarak elde edilebilmişken, daha polar fenolik asit ve flavonoidlerin geri kazanım oranları % 30-70 arasındaydı [68].

Bir başka çalışmada fenoller, kurutulmuş (100 °C), öğütülmüş ve elenmiş ( $\leq 500 \mu\text{m}$ ) zeytin yapraklarında metanol ile modifiye edilmiş süperkritik CO<sub>2</sub> kullanılarak izole edilmiştir [69]. Modifiyer içeriği, basınç sıcaklık akış hızı, ekstraksiyon zamanı, biriktirme/yıkayıp alma değişkenleri gibi ekstraksiyon değişkenleri araştırıldı. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda, n-hekzan, etoksietan, etilasetat gibi sıvı çözücüler içinde sonikasyondan elde edilenlere göre daha yüksek fenol içerikli daha temiz ekstraktlar elde edilmiştir. Ancak ekstraksiyon verimi, sıvı metanolden elde edilen verimin sadece % 45'i kadar olmuştur. Ekstraktlar, elektrospreyiyonizasyon-

kütle spektrometresi (ESI-MS) kullanılarak (negatif iyonizasyon modunda) karboksilli asitleri ve fenollerini açısından incelendiler.

Benzer bir çalışmada da, un halindeki soya fasulyesinden, genistin, genistein ve daidzein gibi izoflavonlar, süperkritik CO<sub>2</sub> ile değişik sıcaklık, basınç ve modifiyer yüzdeleri kullanılarak ekstrakte edilmiş ve sonuçlar, soxhlet ve ultra sonikasyon gibi geleneksel teknikler kullanılarak elde edilenlerle karşılaştırılmıştır [70]. Ekstraksiyon, 40-70 °C sıcaklık, 200-360 bar basınç ve hacimce % 70'lik sulu metanolün kullanılan karbondioksite göre mol yüzdesi 0, 5 ve 10 olacak şekilde modifiyer olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. 70 °C ve 200 bar basınçta, % 10 molar yüzdeyle kullanılan modifiyerle elde edilen genistin ve genistein değerleri geleneksel metodlarla elde edilenlerden daha düşük olmuştur. Bu basamakta sıcaklığın etkisinin dominant olduğu gözlemlendi. 50 °C ve 360 bar basınçta elde edilen daidzein değeri ise geleneksel metodlarla elde edilenlerden daha yüksek bulunmuştur. Bu basamakta ise basınç daha etkili parametre olarak gözlenmiştir. Ekstrakte edilen toplam izoflavonoidlerin maksimum miktarı ultra-sonifikasyonda 311,55 mg.g<sup>-1</sup>, soxhlette (212,86 mg.g<sup>-1</sup>) ve süperkritik CO<sub>2</sub> te 86,28 mg.g<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

## **2.9. Bitkilerin odunsu ve kabuklu kısımlarından fenolik bileşik ekstraksiyonu**

Bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda genellikle yaprak ve meyve kısımları kullanılmaktadır. Ancak bitkilerin kök, gövde ve kabuk gibi diğer kısımlarından da elde edilebilirler ve son zamanlarda bu tür çalışmalar da yoğunluk kazanmaya başlamıştır. Bitkilerin lifli kısımlarının asidik hidroliz ürünlerinden yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonları ile elde edilen ekstraktların antioksidan etki gösterdikleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [71, 72]. Bitkilerin odunsu kısımlarından doğrudan sıvı çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların da antioksidan etkiye sahip oldukları bulunmuştur [73, 74].

Asidik hidroliz lignoselülozik materyallerin hemiselüloz kısmının monosakkaritlere parçalanmasını sağlar ve lignin ile selülozun yapıda kalmasına neden olur. Asidik hidrolizatlar şekerleri, şeker dehidrasyon ürünlerini (furfural veya hidroksimetil furfural gibi), asetik asit ve çözünür lignin kısmından gelen bileşikler içerirler [72, 75]. Asidik hidroliz boyunca lignin ve lignin-hemiselüloz bağlarının depolimerizasyonu gerçekleşir. Ligninin çoğu asitte çözünmez (Klason lignin) fakat az da olsa bir kısım lignin asitte çözünür. Sıcak su serbest fenolik asitleri ekstrakte edebilmektedir. Asidik hidroliz basitçe esterleşmiş fenolik asitleri serbest hale geçirebilir. Asitte çözünebilir lignin kısmının tamam fenolik veya polifenolik yapıda kabul edilir [72]. Lignin monomer ve dimerlerinin antioksidan aktif maddeler oldukları gözlenmiştir [76].

Odunsu ve yaprak kısımlarıyla kıyaslandığında, bitkinin kabuk kısmı muhtemel antioksidan etkili bileşiklerin ekstraksiyonu için en ekonomik ve yaygın kaynaktır. *Betula alleghaniensis* Britton kabuklarından lupeol, betulin ve betulilnik asit gibi yüksek biyolojik aktiviteli triterpen bileşikler ekstrakte edilmiştir [77].

Bu örneklerden açıkça anlaşılacağı üzere, bitkilerin meyve ve yapraklarının haricindeki kısımlardan da antioksidan etki gösterebilen bileşikler elde edilebilmektedir.

## **2.10. Çalışma Materyali Hakkında Botanik Bilgi ve Çalışmanın Amacı**

*Laurocerasus officinalis* Roem., yaklaşık 6 m'ye kadar boylanabilen, yıl boyu yaprak dökmeyen, ağaçtan daha küçük bir bitkidir. 20-2000 m yükseltileri arasında, çoğunlukla ormanlık alanlarda *Fagus* ve *Rhododendron* türleri ile birlikte yetişir [78]. Rosaceae familyasına ait bir bitki olup benzer isimleri: *Padus Laurocerasus* (L.) Miller, *Cerasus Laurocerasus* (L.) Lois, *Laurocerasus Vulgaris* Carr. dir [79].

Bitkinin değişik kısımları farklı maksatlarla kullanılmaktadır. Örneğin, yapraklarından, sakinleştirici, narkotik ve antispazmotik bileşikler elde edilmekte, meyve ve yaprakları aynı zamanda parfüm ve boya sanayinde kullanılmaktadır [80]. Doğu Karadeniz Bölgesinde “karayemiş” adıyla bilinir. Karayemiş, diüretik ve antidiabetik özelliklere sahip olup, bölgede sindirim sistemi problemleri, bronşit, ekzema, hemoroid tedavisinde kullanılmaktadır [81-83]. *Laurocerasus officinalis*, Rosaceae familyasında ve Prunoideae altgrubunda *officinalis* türüne aittir ve aynı zamanda taflan veya yabani kiraz olarak da bilinmektedir. Türkiye’nin doğu Karadeniz bölgesinde, Balkanların bazı kısımlarında, Kuzey İrlanda’da, batı Avrupa’da, güney ve batı Kafkasya’da, İran’da, doğu Marmara’da ve bazı Akdeniz ülkelerinde yetişmektedir.

*Laurocerasus officinalis*, dekoratif maksatlarla peyzaj mimarisinde de kullanılabilmekte, meyvesi hem taze hem de kuru haliyle ve aynı zamanda reğel, pestil, marmelat ve içecek şeklinde de tüketilmektedir [81, 84]. Türkiyenin Doğu Karadeniz Bölgesinde yakacak odun olarak da kullanılmaktadır [85]. *L. officinalis* birçok bitkinin yaptığı gibi çoğunlukla fenol veya fenollerin oksijen-substitue türevleri olan aromatik maddeler sentezleyebilmektedir [81].

Yapılan literatür incelemesinde *Laurocerasus officinalis* Roem bitkisinin antioksidan ve fenolik bileşik içeriği ile ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bunların büyük bir kısmı da bitkinin yaprak ve meyvelerinden biyolojik aktiviteye sahip ekstraktlar eldesi, ayrıca odunsu kısımlarından enerji üretimi ile ilgilidir [80, 81, 85, 86]. Oysa Karadeniz bölgesinin bu karakteristik bitkisinin kabuk ve odunsu kısımlarından da antioksidan etkiye sahip ekstraktlar ve fenolik bileşikler elde edilebileceği düşünölmektedir. Bu amaçla bu bitkinin yaprak, kabuk ve gövde kısımlarından hazırlanan numunelerin değişik çözücüler kullanılarak soxhlet ve süperkritik akışkan ekstraktlarının elde edilmesi, elde edilen bu ekstraktların, DPPH radikal temizleyici aktivitesi ve demir iyonu indirgeme antioksidan gücü belirleme yöntemleri ile antioksidan aktiviteleri, Folin-Ciocalteau yöntemiyle de toplam polifenol bileşik

içerikleri, HPLC-UV tekniği ile de içeriklerindeki fenolik bileşiklerin (özellikle fenolik asitlerin) miktarlarının belirlenmesi planlanmıştır.



### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Numune Hazırlama

*Laurocerasus Officinalis* Roem. bitkisine ait numuneler, mayıs 2006 döneminde Trabzon ili, Akçaabat ilçesi, Güneyköy köyünden toplandı. Güneş ışığı ve nemden korunarak en kısa sürede laboratuvar ortamına alındılar. Burada numuneler yaprak, kabuk ve gövde (odunsu kısım) olmak üzere üç kısma ayrıldı. Doğrudan güneş ışığı almayacak şekilde serin ve kuru hava akımında bırakılarak kurumaları sağlandı.. Tüm numuneler önce mekanik yöntemlerle yaklaşık 0,5-1,0 cm büyüklüğe kadar küçültüldü. Ardından IKA A11 basic model bir değirmende öğütüldüler ve RETSCH AS 200 model bir elek sallayıcıda elenerek 125 µm'den küçük, 125-250 µm arası ve 250 µm'den büyük olmak üzere üç farklı parçacık büyüklüğüne ayrıldılar. Amber renkli saklama şişelerine alındıktan sonra şişelerin boş kısımlarındaki hava azot ile değiştirildi. Kapakları sıkıca kapatıldı ve deneylerde kullanılmaya kadar karanlıkta + 4 °C'de muhafaza edildiler.

#### 3.2. Kullanılan Malzeme, Çözücü, Reaktif ve Standart Maddeler

Deneylerde kullanılan fenolik standart maddeler olan benzoik asit, p-hidroksi benzoik asit, kafeik asit, klorojenik asit, gallik asit, gentisik asit, p-kumarik asit, protokatekuik asit, p-vanillin, sinapik asit, siringik asit, siringaldehit, vanillik asit Sigma (Almanya)'dan, ferulik asit, protokatekaldehit, Folin-Ciocalteu reaktifi, Alkan Standart Karışımı, DPPH (1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil) reaktifi, asetonitril (HPLC derece), n-hekzan (HPLC derece), metanol (HPLC derece), etil asetat (HPLC derece), aseton, dietil eter ve donar asetik asit Fluka (Almanya)'dan satın alındı. HPLC şırınga filtreleri (13 mm, 0.45 µm) Millipor hydrophilic PVDF satın alındı.

### **3.3. Ekstraktların Hazırlanması**

#### **3.3.1. Soxhlet ekstraktlarının hazırlanması**

Daha önceden öğütülüp hazırlanmış olan üç farklı parçacık boyutundaki numunelerden parçacık boyutu 125 µm'den küçük olan numuneler kullanıldı. Bu amaçla 0,1 mg hassasiyetle tartılmış yaklaşık 20 g numune, kullanılacak ekstraksiyon çözücüsü ile önceden yıkanmış ve elenmiş aynı miktardaki kumla homojen bir şekilde karıştırılarak aynı ekstraksiyon çözücüsü ile önceden yıkanmış olan ekstraksiyon kartuşuna alındı. Kartuş 100 ml hacmindeki soxhlet ekstraksiyon cihazında yerleştirildi ve kaynama balonuna 150 ml kadar ekstraksiyon çözücüsü ve birkaç kaynama taşı konularak 6 saat (36 sifon) artık renkli sifon gelmeyinceye kadar ekstrakte edildi. Ekstraksiyon çözücüsü olarak literatürde de en fazla kullanılan çözücü olan metanol (HPLC derece) kullanıldı [87].

Elde edilen ekstrakt, partiküllerinden arındırılmak üzere mavi bandan süzüldü ve döner buharlaştırıcıda kurutuldu. Elde edilen kuru ekstraktın miktarı 0,1 mg hassasiyetle tartılmak suretiyle belirlendi ve tekrar metanolde çözülerek konsantrasyonu kesin olarak bilinen stok çözelti elde edildi. Elde edilen stok çözelti ışık almayacak şekilde bir cam kap içine alındı. Çözelti kabının içindeki atmosfer azot atmosferi ile değiştirilerek kapağı sıkıca kapatıldı ve ileri analizler için + 4 °C'de bir soğutucuda saklandı. Bu şekilde yaprak, kabuk ve gövde olmak üzere üç farklı stok çözelti elde edildi.

#### **3.3.2. Süperkritik akışkan ekstraktlarının hazırlanması**

Süperkritik akışkan deneyleri iki kısımda ele alındı. İlk kısım, sabit ekstraksiyon parametreleri kullanılarak gerçekleştirilen ve ekstraktların antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik madde tayinleri gibi deneysel çalışmaların haricinde,

fenolik bileşik içeriklerinin de tespiti için yapılacak olan HPLC-UV deneyleri için ana ekstraktların hazırlanması, ikinci kısım ise parçacık büyüklüğü, zaman ve çözücü gibi ekstraksiyon parametrelerinin, ekstraktların toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktiviteleri üzerine etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen kinetik çalışma kısmı ekstraktlarının hazırlanması şeklinde planlandı.

### **3.3.2.1. Ana çalışma kısmı ekstraktlarının hazırlanması**

Numunelerin soxhlet ekstraktları ile bir karşılaştırmasını yapmak üzere çözücü olarak yine metanol kullanılarak statik süperkritik metanol ekstraktları elde edildi. Bu amaçla,  $75 \pm 1$  ml hacminde 316 no paslanmaz çelikten el yapımı bir otoklav kullanıldı. 30 mm iç, 60 mm dış çapa, 170 mm yüksekliğe sahip olan otoklav, M12 35x1,5 ölçülerinde yivli yükleme ağzına sahip olup, yüklemenden sonra aynı ölçülerdeki vida tipi bir kapak ile kapatılarak kullanıldı.

Her bir ekstraksiyon basamağında,  $125 \mu\text{m}$ 'den küçük olan numunelerden (yaprak, kabuk veya gövde) 0,1 mg hassasiyetle tartılan yaklaşık 2 g numune kullanılacak çözücünün 15 ml'si ile karıştırılarak otoklava yüklendi. Daha sonra otoklavın içindeki atmosfer azot atmosferi ile değiştirildi ve kapağı bakır conta kullanılmak suretiyle sızdırma yapmayacak şekilde kapatıldı. Otoklav, sıcaklığı kullanılan çözücünün kritik sıcaklığının yaklaşık  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  üzerine ayarlanmış olan silindirik bir ısıtıcıya yerleştirilerek 5 dk'lık bir ön ısıtmadan sonra, 30 dk'lık statik ekstraksiyona tabi tutuldu. Kullanılan çözücü metanol olduğundan sıcaklık  $245,1 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye ayarlandı (Metanol'ün kritik sıcaklığı  $240,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Ekstraksiyon ortamının sıcaklığı bir termoçift yardımıyla kontrol edildi. Yeterli antioksidan aktif madde konsantrasyonlarına ulaşabilmek için soxhlet ekstraksiyonlarında kullanılan madde miktarları esas alınarak her bir numune için on paralel ekstraksiyon gerçekleştirildi ve elde edilen ekstraktlar birleştirildi.

Ekstraksiyon süresinin tamamlanmasından sonra, otoklav, ortam sıcaklığına kadar soğutuldu ve içeriği kullanılan çözücü ile yıkanarak ayrı bir toplama kabına alındı. Toplama kabı içindeki atmosfer de ekstraktın havadaki oksijen ve diğer oksitleyici maddelerde etkilenmemesi için azot atmosferi ile değiştirildi. Tüm ekstraksiyonların tamamlanmasından sonra elde edilen toplam ekstrakt vakum altında mavi band süzgeç kağıdından süzüldü, çözücüsü bir döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak kuru ekstrakt elde edildi. Kuru ekstraktın kütlesi 0,1 mg hassasiyetle tartılarak belirlendikten sonra HPLC derece metanolde çözülerek konsantrasyonu belli olan üç farklı stok çözelti (yaprak, kabuk, gövde) elde edildi. Soxhlet ekstraktlarında olduğu gibi bu çözeltilerin bulunduğu kaplardaki hava, azot atmosferi ile değiştirilerek + 4 °C’de karanlıkta ileri deneylerde kullanılmak üzere saklandılar.

### **3.3.2.2. Kinetik çalışma kısmı ekstraktlarının hazırlanması**

Çalışmanın kinetik kısmında, süperkritik akışkan ekstraktlarının toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktiviteleri üzerine parçacık büyüklüğü, zaman ve çözücü gibi parametrelerin etkisini incelemek amacıyla ekstraktlar elde edildi. Tüm deneylerde kabuk ve gövde numunelerinin miktar olarak yetersizliği nedeniyle yaprak numuneleri kullanıldı.

#### *i) Parçacık büyüklüğü etkisinin incelendiği ekstraktların hazırlanması:*

Bu deneylerde 0-125 µm, 125-250 µm ve 250-500 µm parçacık büyüklüğüne sahip yaprak numuneleri kullanıldı. Çözücü olarak metanol seçildi. Ekstraksiyon süresi olarak 5 dakikalık bir ön ısıtma periyodunun ardından 30 dakikalık statik ekstraksiyon uygulandı. Sıcaklık metanol’ün kritik sıcaklığı olan 240,1 °C’nin 5 °C üzerine sabitlendi (245,1 °C). Ekstraktların elde edilmesi için uygulanan sonraki

kısımlar, ana çalışma kısmı ekstraktlarının hazırlanmasında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

*ii) Zamanın etkisinin incelendiği ekstraktların hazırlanması:*

Bu ekstraktların hazırlanmasında 125-250 µm parçacık büyüklüğüne sahip yaprak numuneleri kullanıldı. Çözücü yine metanol ve ekstraksiyon sıcaklığı da 245,1 °C olarak uygulandı. Ekstraksiyon süreleri olarak 5 dakikalık ön ısıtma periyodunu takiben uygulanan 15, 30 ve 45 dakikalık süreler seçildi. Sonraki basamaklar ana çalışma kısmı ekstraktları ile benzer şekilde gerçekleştirildi.

*iii) Çözücü etkisinin incelendiği ekstraktların hazırlanması:*

Bu ekstraksiyonlarda, 0-125 µm parçacık büyüklüğüne sahip yaprak numuneleri kullanıldı. 5 dakikalık ön ısıtma periyodunu takiben uygulanan 30 dakikalık statik ekstraksiyonlarda çözücü olarak metanol, etil asetat ve n-hekzan gibi üç farklı polaritedeki organik çözücüler seçildi. Ekstraksiyonların bundan sonraki kısımları ana çalışma kısmı ekstraksiyonları ile aynı olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen tüm ekstraktlar yine azot atmosferinde, karanlıkta ve + 4 °C’de saklandılar.

### **3.4. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde İçeriklerinin ve Antioksidan Aktivitelerinin Ölçülmesi**

#### **3.4.1. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Tayini**

Ekstraktların toplam fenolik içerikleri, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak Slinkard ve Singleton metodu [88], hafif değişikliklerle uygulanarak tayin edildi. Bunun için

stok çözeltilerden kullanılan çözücü ile seyreltilerek hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyona sahip çözeltiden 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 çözeltiden 250 µl ilave edildi ve karıştırılarak oda sıcaklığında 3 dk bekletildi. 7,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'ın 100 ml suda çözülmesi ile hazırlanan % 10'luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 750 µl ilave edildi. Vortekslenerek karıştırılan karışım, oda sıcaklığında 2 saat bekletildi ve THERMOSPECTRONIC Heliosα marka bir UV cihazı kullanılarak 765 nm'de absorbans değerleri okundu. Deneyler üç paralel olarak tekrar edildi ve kör olarak saf su kullanıldı. Kör absorbansı A1 ve üç paralelin absorbans ortalaması A2 olmak üzere:

$$\Delta A = A2 - A1$$

Eşitliğinden absorbans farkları hesaplandı. Aynı işlemler, konsantrasyonları 15,63; 31,25; 62,5; 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml olan 7 standart gallik asit çözeltisi kullanılarak tekrar edildi ve absorbans farkları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edildi. Ekstraktların toplam fenolik madde içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g hava kurusu numune ± standart sapma (SS) olarak verildi.

#### **3.4.2. DPPH radikal temizleme antioksidan aktivite tayini**

Ekstraktlar, Cuendet ve arkadaşlarının metodu [89], hafif değişikliklerle kullanılarak DPPH radikal temizleme antioksidan aktiviteleri açısından incelendiler. Bunun için stok çözeltilerden hazırlanan 15,63; 31,25; 62,5; 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyona sahip ekstraktlar kullanıldı (bazı durumlarda bunlara 7,81 ve 3.9 µg/ml'lik konsantrasyonlara sahip numuneler de ilave edildi). Bu ekstraktlardan her birinden alınan yaklaşık 750 µl'lik bir kısımlar, DPPH radikalinin metanolde

hazırlanan  $1.10^{-4}$  M'lık kararlı çözeltisinden alınan 750 µl'lik miktarlarla karıştırılarak bir vorteks karıştırıcıda kuvvetlice çalkalandıktan sonra 50 dk kadar oda sıcaklığında bekletildi ve THERMOSPECTRONIC Heliosα marka bir UV cihazı kullanılarak 517 nm'de absorbanları okundu. Her bir numune iki paralel olarak test edildi ve her bir konsantrasyona ait sadece numune çözeltisini ve ekstrakt çözücüsünü içeren bir tüp kör olarak aynı absorban değerinde okundu. Kontrol tüpleri üç paralel olarak hazırlandı ve bu tüplere sadece DPPH çözeltisi ile DPPH çözeltisinin çözücüsü (metanol) konuldu. 50 dk bekletildikten sonra 517 nm'de absorbanları okundu. Deneyler karşılaştırma maddeleri olarak kullanılan BHT ve Trolox kullanılarak tekrar edildi. Elde edilen absorban değerlerinin ortalamasından körlerin ortalaması çıkarıldı. Bu değerlerden % temizleme (% I) değerleri

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

eşitliği kullanılarak hesaplandı. Burada  $A_0$ , kontrol tüplerinin (sadece DPPH çözeltisi içeren) absorban ortalamalarını,  $A_1$ , numune tüplerinin (ekstrakt ve DPPH çözeltisi içeren) absorban 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 çözeltilerinin konsantrasyon değerleri ( $IC_{50}$ ) hesaplandı. Sonuçlar µg/ml ± standart sapma (SS) olarak verildi.

### **3.4.3. Fe-III iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) tayini**

Bu testlerde, IRIS ve arkadaşlarının [90], yöntemi küçük değişikliklerle modifiye edilerek uygulandı. Önce 200 ml 300 mM'lık asetat tampon çözeltisi (pH = 3,6), 20 ml 10 mM'lık 2,4,6-tri[2-pridil]-s-triazin (TPTZ) çözeltisi, 20 ml 20 mM'lık  $FeCl_3$  çözeltisi ve 24 ml distile su karıştırılmak suretiyle FRAP ayracı hazırlandı ve 37

°C’de su banyosunda tutularak muhafaza edildi. 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µM’lık C vitamini çözeltileri kullanılarak standart kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Deneylerde 3,0 mL FRAP reaktifi ile 100 µL numune çözeltilisi karıştırılıp 20. dakikada 595 nm de absorbans THERMOSPECTRONIC Heliosα model bir cihazda absorbansları ölçüldü. Ekstraktlar iki paralel ve bir kör olmak üzere çalışıldı. Ekstraktların ortalamasından körlerin ortalamaları çıkartıldı. Elde edilen absorbansa karşılık gelen mikromolar (µM) FRAP değeri, C vitamini kalibrasyon grafiğinden tespit edilip, C vitamininin konsantrasyonunun iki ile çarpılmasıyla elde edildi.

### **3.5. HPLC-UV Analizleri**

UV (Ultraviyole) ya da MS (kütle spektroskopisi) deteksiyonuyla birlikte RP-LC (ters faz-sıvı kromatografisi) bitki ekstraktlarının fenolik bileşimleri için kullanılan bir metottur. Fenollerin ayrılması genellikle metanol (MeOH) veya asetonitril (CH<sub>3</sub>CN, ACN) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren su hareketli fazlarıyla çalışan C18 kolonlarında gerçekleştirilir. Mobil fazda fenolik asitlerin protonlaşmalarını sağlamak için formik asit (HCOOH), asetik asit (AcOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) gibi asitler asidik modifiye ediciler olarak kullanılırlar ve böylece pik şekli ve çözünürlüğün gelişmesi sağlanır [91].

Ekstraktların fenolik asit içeriğini belirlemek için uygulanan tüm prosedür, bulgular kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Ancak aşağıda kalibrasyon ve analiz koşulları hakkında kısa bilgi ayrıca sunulmuştur.



### 3.5.1. Standartlar ve Kalibrasyon

Tüm stok çözeltiler % 40'lık metanolde 50 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. 15 standardın 5 ayrı konsantrasyonda çözeltileri stok çözeltilerin % 40'lık metanolde seyreltilmesiyle hazırlandı. Her bir standardın konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi. Çeşitli standartların kalibrasyonu için sıralanan dalga boyları kullanıldı: gallik asit, protokatekuik asit, protokatekaldehit, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, siringik asit, vanillin ve benzoik asit için 280 nm, gentsik asit, klorogenik asit, kafeik asit, siringaldehit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit için 315 nm.

### 3.5.2. LC-UV Koşulları

RP-LC-UV analizleri Agilent (Almanya)'den bir ultraviyole dedektör ile donanımlı 1100 LC'de yapıldı. Enstrüman Chemstation programı ile (Agilent) kontrol edildi. Tüm analizler için bir Hichrom C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül) kullanıldı. Hareketli faz (A) % 2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) 50/50 asetonitril/su içindeki % 0,5 asetik asitin çözeltilerinden oluşmaktaydı. Elüsyonda takip eden gradient kullanıldı: Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-7 dk % 5 B; 7-8 dk % 5-15 B; 8-17 dk % 19-81 B; 17-18 dk % 23-77 B; 18-19 dk % 24-76 B; 19-21 dk B % 25-75; 21-32 dk B % 35-65; 32-34 dk % 35-65 B; 34-39 dk. Enjeksiyon hacmi 20 µl Akış hızı 1,2 ml.dk<sup>-1</sup> idi ve detektör 280 ve 315 nm'lerde çalıştırıldı.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Ana Çalışma Kısmı Ekstraktları Üzerinde Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

#### 4.1.1. Yapılan ekstraksiyonların verim yüzdeleri

Yapılan ekstraksiyon deneylerinin her birinin verimi hesaplandı ve aşağıdaki Çizelge 5’de ve Şekil 6’da verildi.

Verim yüzdeleri,

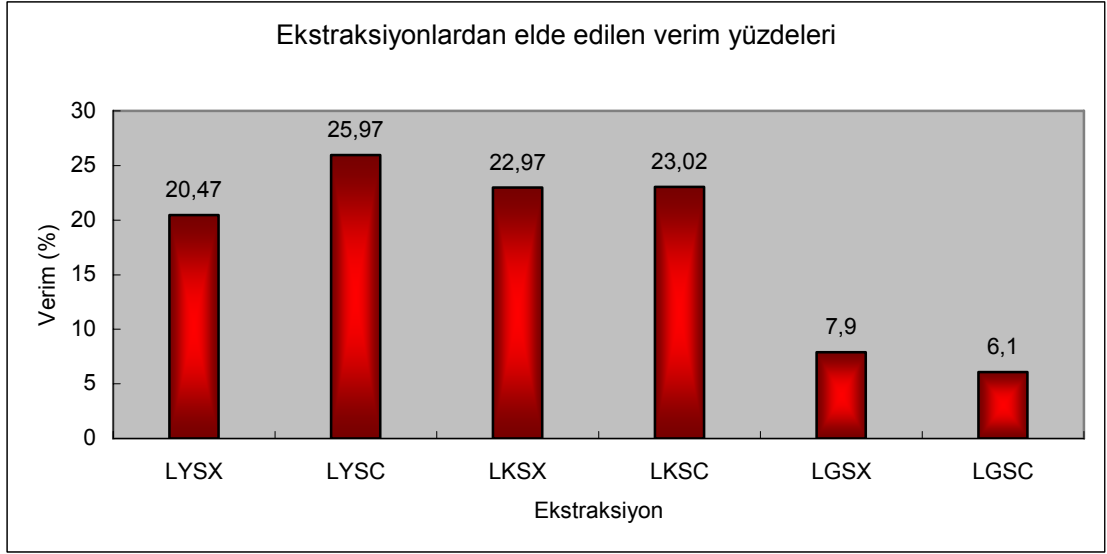
$$\% \text{ Verim} = [\text{Kuru Ekstrakt miktarı}/\text{Havada Kuru Numune Miktarı}] \times 100$$

eşitliğinden hesaplandı.

Çizelge 5. Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

Ekstraksiyon*	Verim (%)
LYSX	20,47
LYSC	25,97
LKSX	22,97
LKSC	23,02
LGSX	7,90
LGSC	6,10

\* LYSX: Laurocerasus-Yaprak-Soxhlet; LYSC: Laurocerasus-Yaprak-Süperkritik; LKSX: Laurocerasus-Kabuk-Soxhlet; LKSC: Laurocerasus-Kabuk-Süperkritik; LGSX: Laurocerasus-Gövde-Soxhlet; LGSC: Laurocerasus-Gövde-Süperkritik;

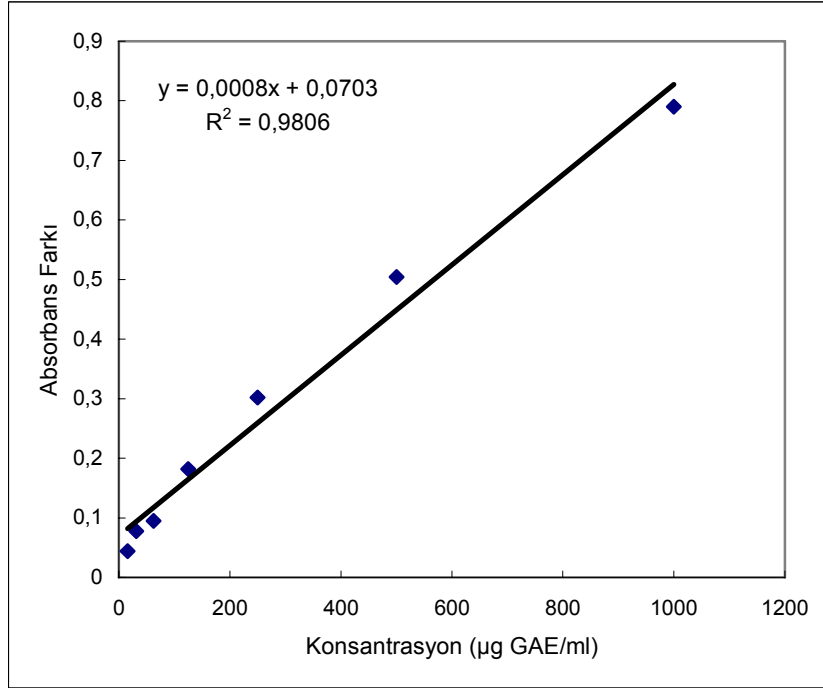


Şekil 6. Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

Çizelge 5’de en dikkat çekici husus, *Laurocerasus officinalis* Roem., bitkisinden elde edilen gövde ekstraktı veriminin yaprak ve kabuk ekstrakt veriminden çok daha düşük düzeyde kalmış olmasıdır. Bunun haricinde yaprak ve kabuk ekstraksiyon veriminde süper kritik ekstraksiyon verimleri daha yüksek sonuç vermiştir.

#### 4.1.2. Toplam fenolik madde tayini deneylerinden elde edilen bulgular

Numunelerin Folin-Ciocalteu yöntemine göre ölçülen toplam fenolik madde içerikleri için hazırlanan kalibrasyon grafiği ve elde edilen sonuçlar Şekil 7 ve Çizelge 6’da verildi. Kalibrasyon grafiği gallik asit kullanılarak hazırlandı. Daha rahat karşılaştırma ve yorum yapabilmek için Çizelge 6’da verilen değerlerden Şekil 8’deki sütun grafik çizildi.

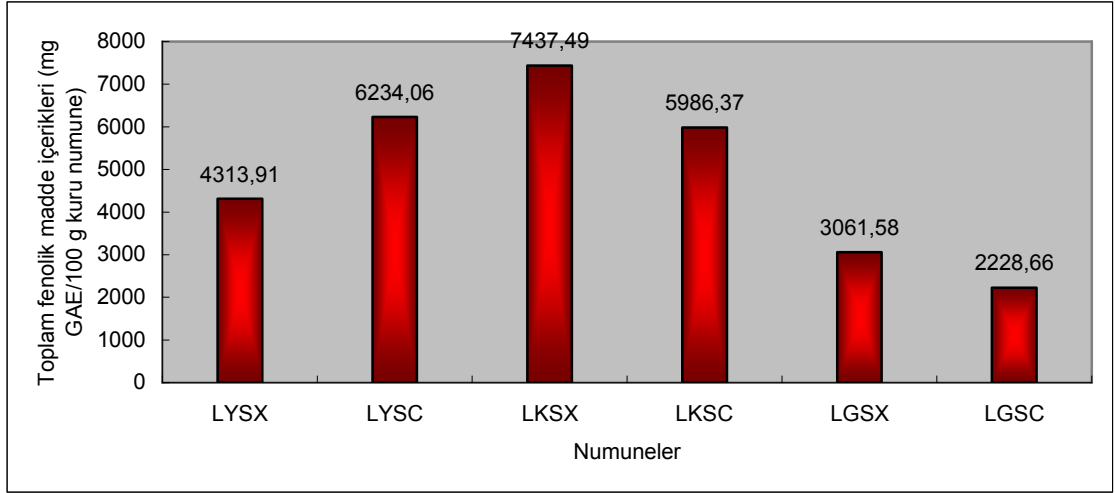


Şekil 7. Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği

Çizelge 6. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)

Ekstrakt*	Toplam Fenolik Madde
LYSX	4313,91
LYSC	6234,06
LKSX	7437,49
LKSC	5986,37
LG SX	3061,58
LG SC	2228,66

\* LYSX: Laurocerasus-Yaprak-Soxhlet; LYSC: Laurocersus-Yaprak-Süperkritik; LKSX: Laurocerasus-Kabuk-Soxhlet; LKSC: Laurocerasus-Kabuk-Süperkritik; LG SX: Laurocerasus-Gövde-Soxhlet; LG SC: Laurocerasus-Gövde-Süperkritik



Şekil 8. Ekstraktların karşılaştırmalı toplam fenolik madde içerikleri

Çizelge 6 ve Şekil 8'e bakıldığında, yaprak ekstraktlarında süperkritik metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriklerinin Soxhlet ekstraktlarından elde edilenlerden daha yüksek olduğu, kabuk ekstraktlarında ise Soxlet ekstraktlarının daha yüksek toplam fenolik madde içeriği sergilediği görülmektedir. Gövde ekstraktlarında da Soxhlet ekstraktlarının daha yüksek sonuç verdiği gözlemlenmektedir. *Laurocerasus officinalis* Roem ekstraktlarında Soxhlet metanol ekstraktları daha yüksek toplam polifenolik madde içeriği ortaya koydu. Genel olarak, en yüksek toplam fenolik madde miktarlarının kabuk ekstraktlarından, onları takiben yaprak ekstraktlarından ve en düşük değerlerin gövde ekstraktlarından elde edildiği söylenebilir. Ancak, yaprak ekstraktlarında süperkritik ekstraktlar daha iyi değerler ortaya koydu.

Sonuç olarak, *Laurocerasus officinalis* Roem.'in kabuklarından elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içeriğinin yüksek olduğu söylenebilir.

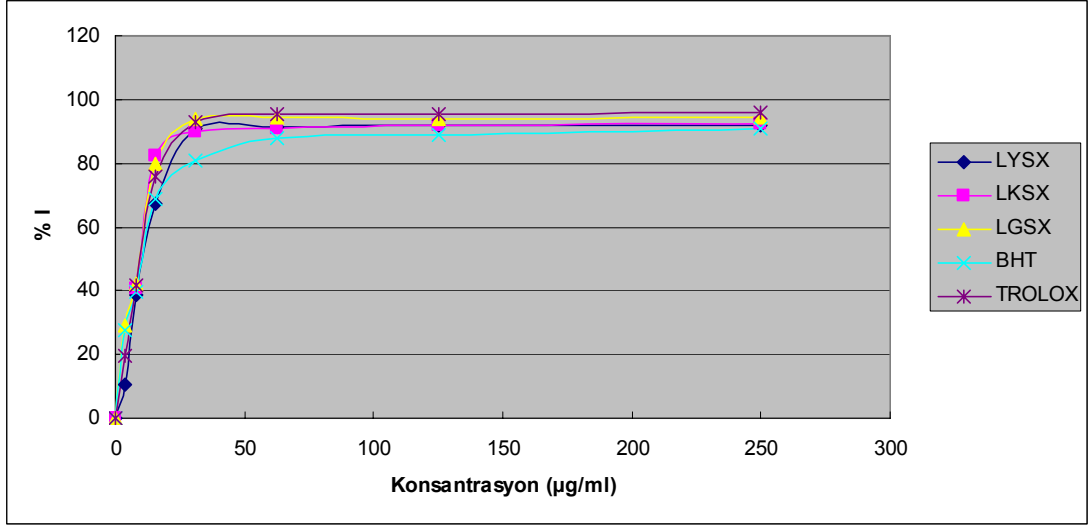
#### 4.1.3. DPPH radikal temizleme antioksidan aktivite tayini deneylerinden elde edilen bulgular

Her bir ekstraktın ve karşılaştırma maddelerinin, DPPH konsantrasyonunun yarısını temizlemek için gerekli olan konsantrasyonları olan % 50 temizleme (IC<sub>50</sub>) değerleri Çizelge 7’de verilmiştir.

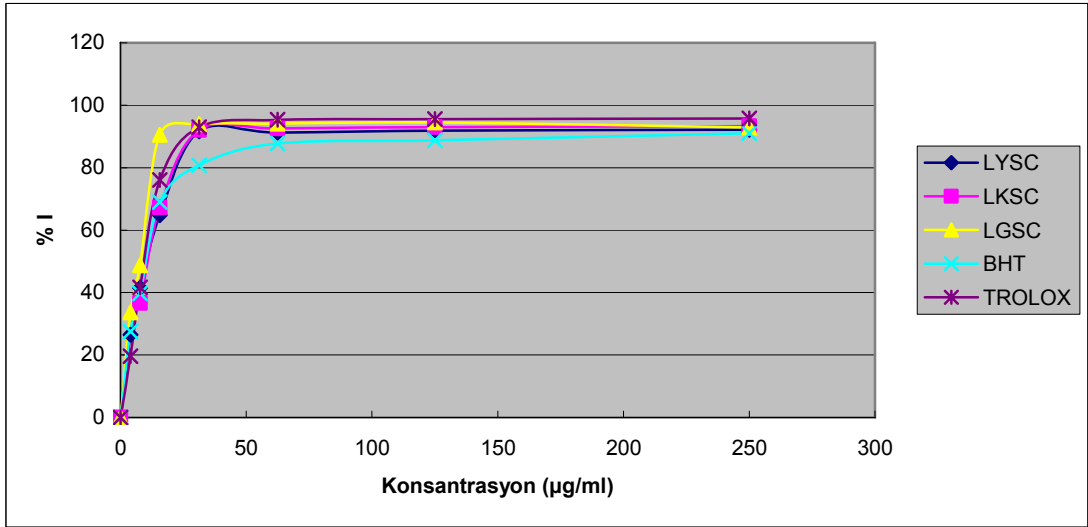
Çizelge 7. Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin IC<sub>50</sub> değerleri (µg/ml)

Ekstrakt	IC <sub>50</sub> Değeri
LYSX	11,20
LYSC	11,07
LKSX	9,55
LKSC	11,39
LG SX	9,32
LGSC	8,05
BHT	10,61
TROLOX	10,06

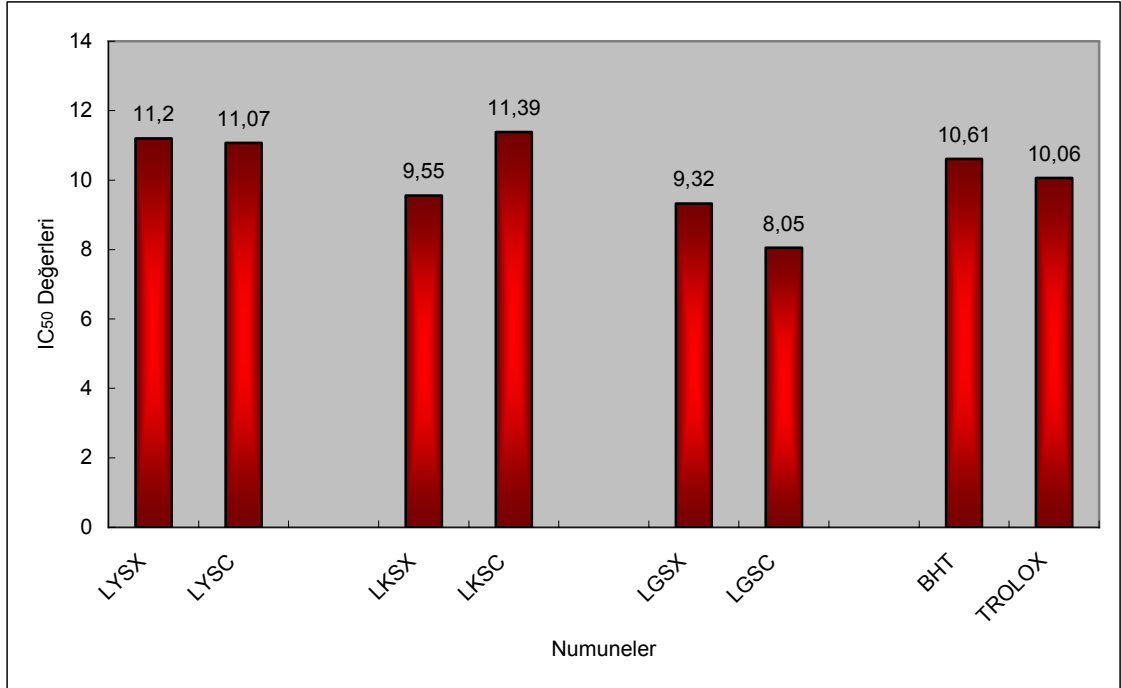
*Laurocerasus officinalis* Roem bitkisinin Soxhlet ve Süperkritik metanol ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdelerini (% I) gösteren Şekil 9 ve 10 aşağıda verilmiştir. Ayrıca, ekstraktların DPPH radikalini temizleme aktiviteleri açısından birbirleri ile karşılaştırmalarını yapabilmek için çizilen sütun grafik Şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 9. *Laurocerasus officinalis* Roem bitkisinin metanolik Soxhlet ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri.



Şekil 10. *Laurocerasus officinalis* Roem bitkisinin süperkritik metanol ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri.



Şekil 11. *Laurocerasus officinalis* Roem bitkisinin metanolik Soxhlet ve süperkritik ekstraktları ile karşılaştırma maddelerinin DPPH radikalini % 50 temizleme konsantrasyonları (IC<sub>50</sub> değerleri: DPPH Radikali konsantrasyonunun yarısını gidermek için gerekli ekstrakt konsantrasyonu)

DPPH radikalini temizleme yöntemi, bu radikalın hidroksil ve süperoksit radikallerine göre daha kararlı bir yapıya sahip olması ve analiz için gerektirdiği sürenin oldukça kısa olması nedeniyle, antioksidan aktivite ölçümü testlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [92,93].

Çizelge 7. ve Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11'e bakıldığında, genel olarak gövde ekstraktlarının daha düşük değerler (değerin düşük olması ekstraktın antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir) ortaya koydukları dikkati çekmektedir. En düşük IC<sub>50</sub> değerini 8,05 µg/ml ile *Laurocerasus*-Gövde-Süperkritik (LGSC), 9,32 µg/ml ile *Laurocerasus*-Gövde-Soxhlet (LGSX) ve 9,55 µg/ml ile *Laurocerasus*-Kabuk-Soxhlet (LKSX) ekstraktları izledi. Bu değerlerin hepsi de deneylerde karşılaştırma maddeleri olarak kullanılan BHT ve Trolox'un sergilediği değerlerden daha iyi olduğu gözlemlendi. İlginç bir şekilde *Laurocerasus officinalis*



Roem.'den elde edilen gövde ekstraktları oldukça düşük değerler sergiledi (sırasıyla Soxhlet ekstraktı için 9,32 ve süperkritik ekstrakt için 8,05 µg/ml). Yani *Laurocerasus officinalis* Roem.'in gövde ekstraktları düşük toplam fenolik madde içeriklerine rağmen (sırasıyla 3061,58 ve 2228,66 mg GAE/100 g kuru numune) oldukça yüksek antioksidan aktivite özelliği sergiledi. Bu da bu ekstraktların, düşük toplam fenolik madde içeriğine sahip olmalarına rağmen, bu maddelerin çoğunlukla antioksidan aktiviteleri yüksek fenolik bileşiklerden oluşmuş olabileceğini düşündürmektedir.

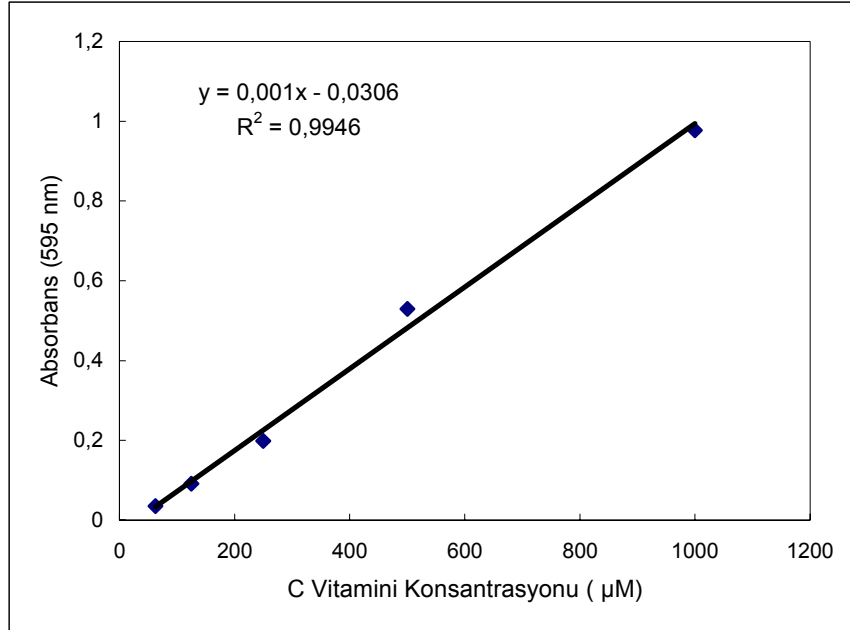
Kabuk ekstraktlarında, Soxhlet ekstraktları süperkritik ekstraktlardan daha düşük IC<sub>50</sub> değeri sergilerken, gövdeden alınan ekstraktlarda ise süperkritik ekstraktlar daha düşük IC<sub>50</sub> değerleri ortaya koydular. Şekil 9 ve 10'da gövde ekstraktlarının (LGSX ve LGSC), hem diğer ekstraktlara hem de karşılaştırma maddelerine göre daha yüksek radikal temizleme yüzdeleri ortaya koydukları açıkça görülmektedir. Örneğin 31,25 µg/ml konsantrasyon düzeyinde ekstraktların radikal temizleme yüzdeleri LGSX için % 93,78 ve LGSC için % 93,97 iken, bu değerler BHT için % 80,75 ve Trolox için % 93,01 olarak elde edilmiştir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda (C > 31,25 µg/ml) özellikle Trolox daha yüksek temizleme yüzdeleri ortaya koymuştur. Deneylede kullanılan karşılaştırma maddelerinden Trolox'un, BHT'den daha yüksek radikal temizleme etkisi sergilediği gözlenmiştir.

Yaprak ekstraktları karşılaştırma maddeleri olan BHT ve Trolox'tan hafifçe daha yüksek değerler ortaya koydular (sırasıyla LYSX için 11,20; LYSC için 11,07; BHT için 10,61 ve Trolox için 10,06 µg/ml).

Bu sonuçlara göre, *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinin yaprak ve meyve kısımlarının haricinde, kabuk ve gövde kısımlarından da önemli ölçüde radikal temizleme antioksidan aktivitesi gösteren ekstraktlar elde edilebileceği söylenebilir. Kabuk ve odunsu kısımlardan elde edilen ekstraktların da önemli derecede fenolik bileşik içerebilecekleri ve antioksidan aktivite sergileyebileceklerine dair elde edilen bu bulgular, literatürdeki verilerle de uyumluluk göstermektedir [94,95,96,97].

#### 4.1.4. Fe-III iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) deneylerinden elde edilen bulgular

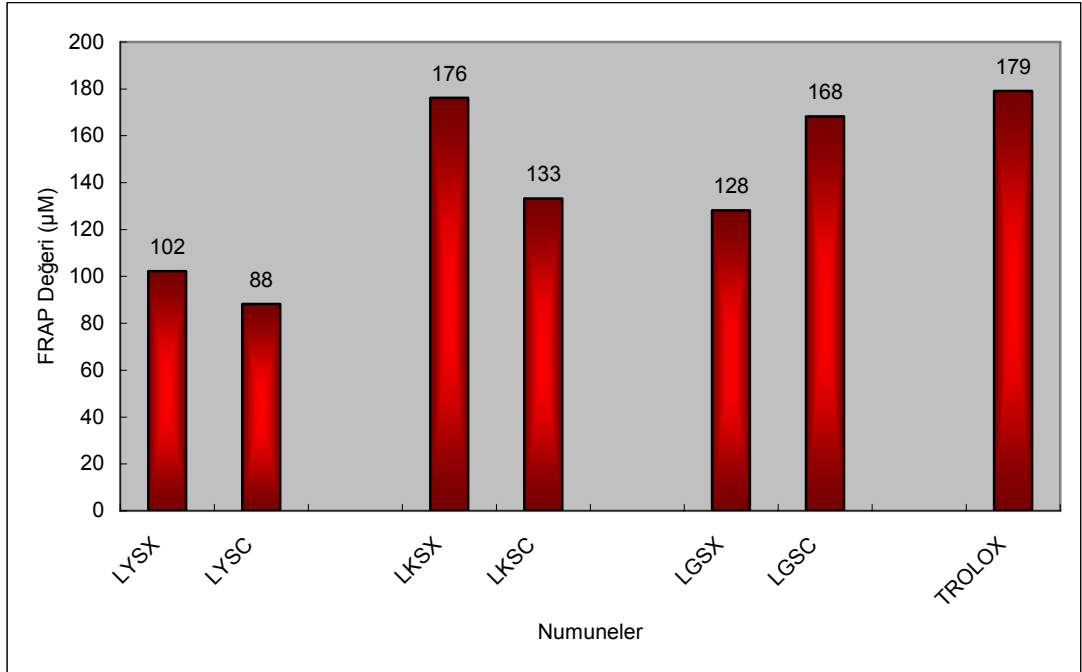
Ekstraktlar (100 µg/ml), FRAP reaktifiyle muamele edildi. 20. dakikada ölçülen absorbanslara karşılık gelen FRAP değerleri C vitamini ile hazırlanan grafikten (Şekil 12) o absorbansa karşılık gelen C vitamini konsantrasyonlarının 2 ile çarpılmasıyla elde edildi (Çizelge 8 ve Şekil 13). Karşılaştırma maddesi olarak Trolox kullanıldı.



Şekil 12. FRAP testinde artan C vitamini konsantrasyonuna bağlı absorbansta meydana gelen değişiklik

Çizelge 8 . Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin FRAP değerleri ( $\mu\text{M}$ )

Ekstrakt	FRAP Değeri
LYSX	102
LYSC	88
LKSX	176
LKSC	133
LGSX	128
LGSC	168
TROLOX	179



Şekil 13. Numunelerin ve standart antioksidan olan Trolox'un FRAP değerleri. Trolox  $500 \mu\text{M}$  ( $125 \mu\text{g/ml}$ ) konsantrasyonda kullanılarak bu konsantrasyonun FRAP eşdeğeri hesaplanmıştır. Numunelerin konsantrasyonu  $100 \mu\text{g/ml}$  dir. Yüksek FRAP değeri yüksek aktiviteyi göstermektedir.

FRAP deneylerinde en yüksek antioksidan aktiviteyi kabuk ve gövde ekstraktları göstermiştir. Özellikle LKSX, LGSC ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri Trolox'un ki ile karşılaştırılabilir düzeydedir (sırasıyla 176, 168 ve Trolox'un FRAP eşdeğeri  $179 \mu\text{M}$ ). Soxhlet ve süperkritik ekstraksiyon teknikleri açısından bir

karşılaştırma yapılacak olursa, *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinin yaprak ve kabuk kısımlarından elde edilen ekstraktlarda Soxhlet tekniği daha başarılı sonuçlar ortaya koydu.

Ekstraktların fenolik madde içerikleri ile FRAP değerleri arasında sadece yaprak ekstraktları açısından doğrusal bir ilişki kurulabilmiştir. Kabuk ve gövde ekstraktları için böyle bir ilişki söz konusu değildir. Bu da ekstrakte olan fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının yanı sıra bitki kısımlarının da önemli olabileceğine işaret etmektedir. Bu konu, çalışmanın sonraki kısımlarında daha detaylı olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçta FRAP testleri de, kabuk ve gövde ekstraktlarının, önemli düzeyde antioksidan özellikler sergileyebileceklerini gösteren DPPH radikal temizleme aktivitesi testlerini destekleyen sonuçlar vermiştir.

#### **4.1.5. RP-LC-UV analizlerinden elde edilen bulgular**

##### **4.1.5.1. Standartlar ve Kalibrasyon**

Tüm stok çözeltiler % 40'lık metanolde 50 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. 15 standardın 5 ayrı konsantrasyonda çözeltileri stok çözeltilerin % 40'lık metanolde seyreltilmesiyle hazırlandı. Her bir standardın konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi. Çeşitli standartların kalibrasyonu için sıralanan dalga boyları kullanıldı: gallik asit, protokatekuik asit, protokatekaldehit, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, siringik asit, vanillin ve benzoik asit için 280 nm, gentsik asit, klorojenik asit, kafeik asit, siringaldehit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit için 315 nm.

#### 4.1.5.2. Ekstraktların HPLC-UV analizi için seyreltilmeleri

Ekstraktlar genel olarak 10mg/ml konsantrasyona metanol içeriği standartlardaki gibi % 40 olacak şekilde suyla seyreltildiler. 10mg/ml olarak % 40'lık metanolik çözelti halinde seyreltilemeyecek kadar düşük konsantrasyona sahip olan ekstraktlar için karşılaştırmanın sağlıklı olması açısından uygun dönüşümler yapılarak analiz sonuçları 10 mg/ml' deki ppm içerik olarak verilmiştir. Bitki kısımlarından süper kritik sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilenler ile Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen kısımlarının konsantrasyonları aynı tutulmuştur. Ekstraktların son konsantrasyonları Çizelge 9'da verilmiştir.

Çizelge 9. Her bir ekstraktın konsantrasyonu (C=mg/ml)

	LYSC	LYSX	LKSC	LKSX	LGSC	LG SX
C (mg/ml)	10	10	10	10	4,84	4,84

#### 4.1.5.3. Ekstraktlardan fenolik bileşiklerin sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonu

Her bir standardın konsantrasyonu 50 ppm olan standart karışımı hazırlandı. Bu karışımın çözücüsü uçurulduktan sonra 10 mL pH=1 olan HCl çözeltisi eklenerek karıştırıldı. Ardından 10 ml etil asetat ile 15 dakika şiddetli karıştırılarak ekstrakte edildi. Organik faz alındı ve tekrar bir 5 ml etil asetat ekstraksiyonunun ardından organik fazlar birleştirildi. 10 ml etil asetat ekstraksiyonunu 5ml etil asetat ekstraksiyonu takip etti ve tüm organik fazlar birleştirilerek bir döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Ardından karışımın başlangıçtaki konsantrasyonu ile aynı konsantrasyona önce metanolde çözülerek metanol içeriği %40 olacak şekilde su ilave edilip ayarlandı. Yöntem aynı şekilde tüm ekstraktlara uygulanırken ekstraktların

konsantrasyonları seçimli ekstraksiyonun öncesinde ve sonrasında Çizelge 9'daki gibi olacak şekilde ayarlandı. Ekstraktlar LC-UV analizinden önce filtreden geçirildi.

#### **4.1.5.4. LC-UV Koşulları**

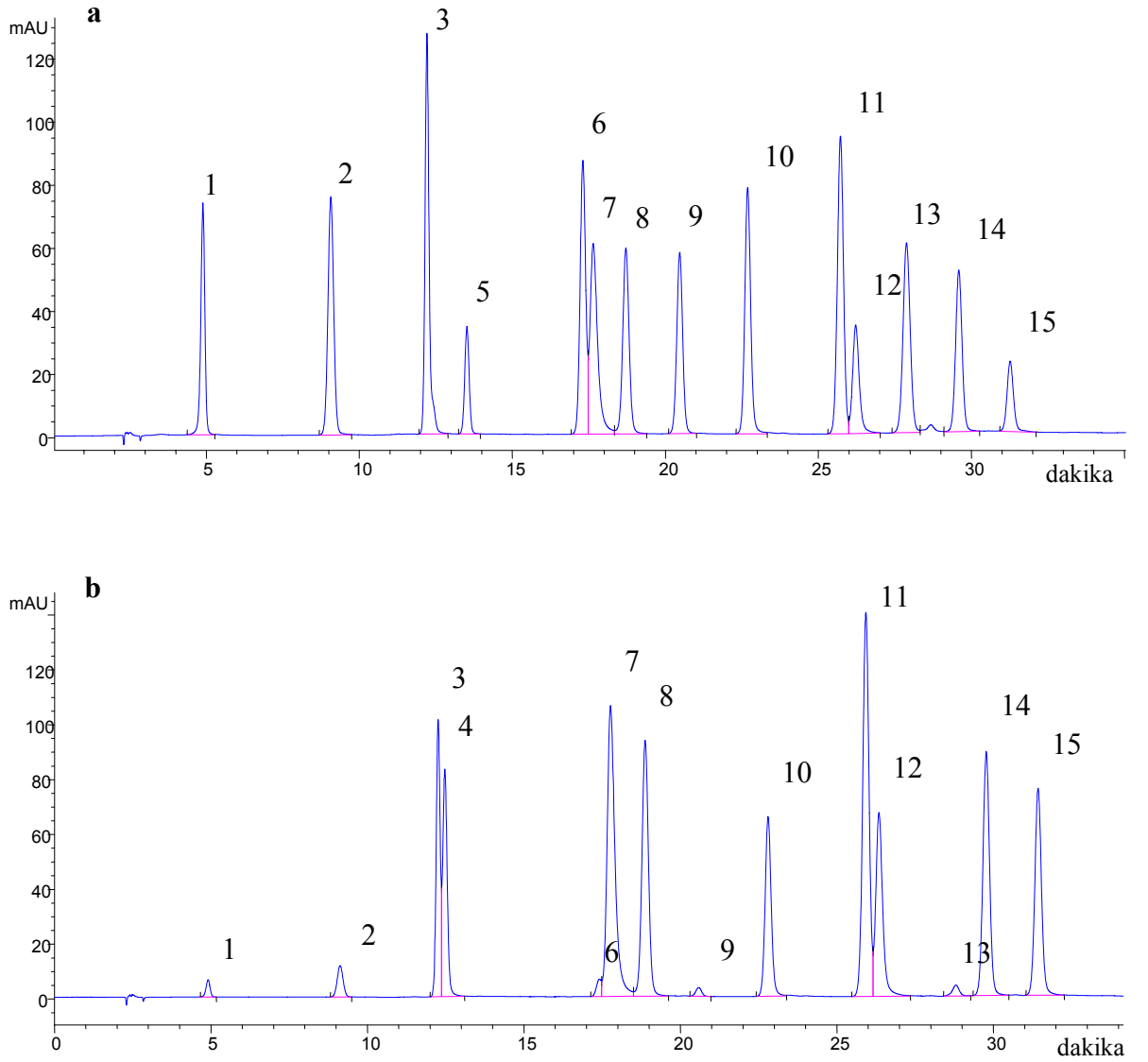
RP-LC-UV analizleri Agilent (Almanya)'den bir ultraviyole detektör ile donanımlı 1100 LC'de yapıldı. Enstrüman Chemstation programı ile (Agilent) kontrol edildi. Tüm analizler için bir Hichrom C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül) kullanıldı. Hareketli faz (A) % 2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) 50/50 asetonitril/su içindeki % 0,5 asetik asitin çözeltilerinden oluşmaktaydı. Elüsyonda takip eden gradient kullanıldı: Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-7 dk % 5 B; 7-8 dk % 5-15 B; 8-17 dk % 19-81 B; 17-18 dk % 23-77 B; 18-19 dk % 24-76 B; 19-21 dk B % 25-75; 21-32 dk B % 35-65; 32-34 dk % 35-65 B; 34-39 dk. Enjeksiyon hacmi 20 µl Akış hızı 1,2 ml.dk<sup>-1</sup> idi ve detektör 280 ve 315 nm'lerde çalıştırıldı.

#### **4.1.5.5. LC-UV İçin Deteksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi**

EPA metoduna göre dedeksiyon limiti hesaplandı (US EPA, 1984). Tüm 15 standardın 2 ppm'lik karışımı LC-DAD ile analiz edildi. Her bir analitin sinyalinin gürültüye oranına (S/N) dayanan değer Chemstation'dan belirlendi, 6 seviyesinde bir S/N sağlamak için gerekli konsantrasyon hesaplandı. Sonuç olarak, tek bir konsantrasyonda tüm numunelerin 7 kez enjeksiyonu sonucunda her bir bileşik için dedeksiyon limiti (LOD) pik alanı ve alıkonma zamanının yüzde bağıl standart sapması (%BSS) olarak hesaplandı.

#### 4.1.5.6. LC-UV Metot Geliştirme

Optimize edilen LC-UV metodu kullanılarak 15 standart fenolik bileşiğin analizine bir örnek Şekil 14'de görülmektedir. Metot, 32 dakika içinde tüm standartların uygun bir şekilde ayrılmasını sağladı.



Şekil 14. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. 1, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 nolu bileşikler 5,25 ppm; 2, 4, 6 ve 7 nolu bileşikler 13,125 ppm; 5 ve 13 nolu bileşikler 52,5 ppm de yürütülmüştür.

Başlangıçta geliştirilen LC-UV metodu hassasiyet ve güçlülük açısından değerlendirildi. Alıkonma zamanı ve pik alanlarının çözünürlüğü LOD için standartlarla hazırlanan çözeltinin 7 kez enjeksiyonu ile belirlendi. Sonuçlar hesaplanan deteksiyon limiti (LOD) ile birlikte Çizelge 10’da mevcuttur. Düşük konsantrasyonlarda pik alanının çözünürlüğü ve alıkonma zamanlarının çözünürlüğü kabul edilebilir değerlerde bulundu. Ayrıca tüm 15 standart için lineer cevaplar ( $R^2 > 0,99$ ) elde edildi. Tüm standartlar için LOD değerleri 0,9 ppm’in altındadır.

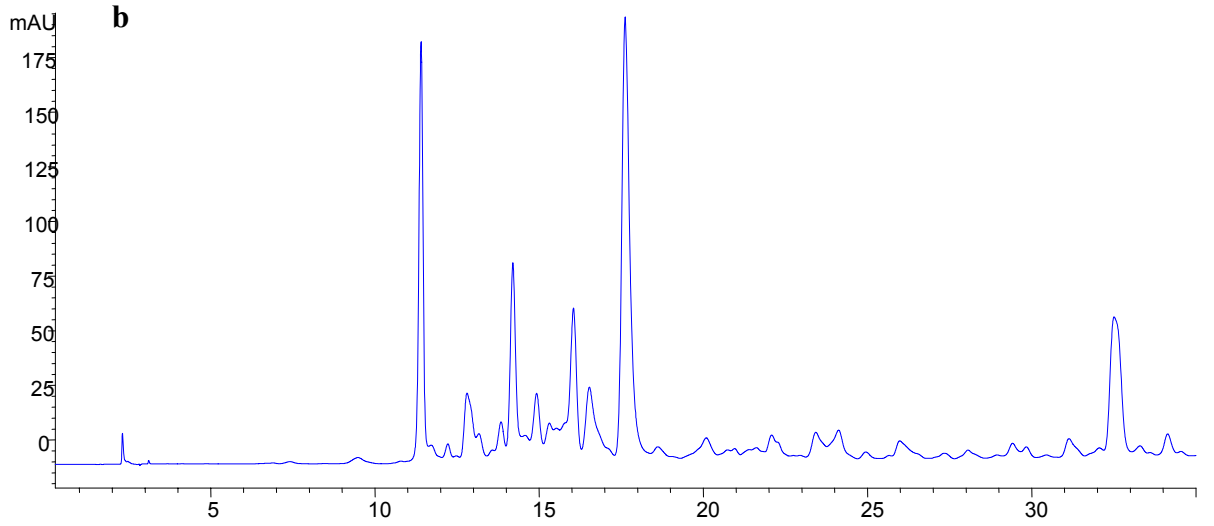
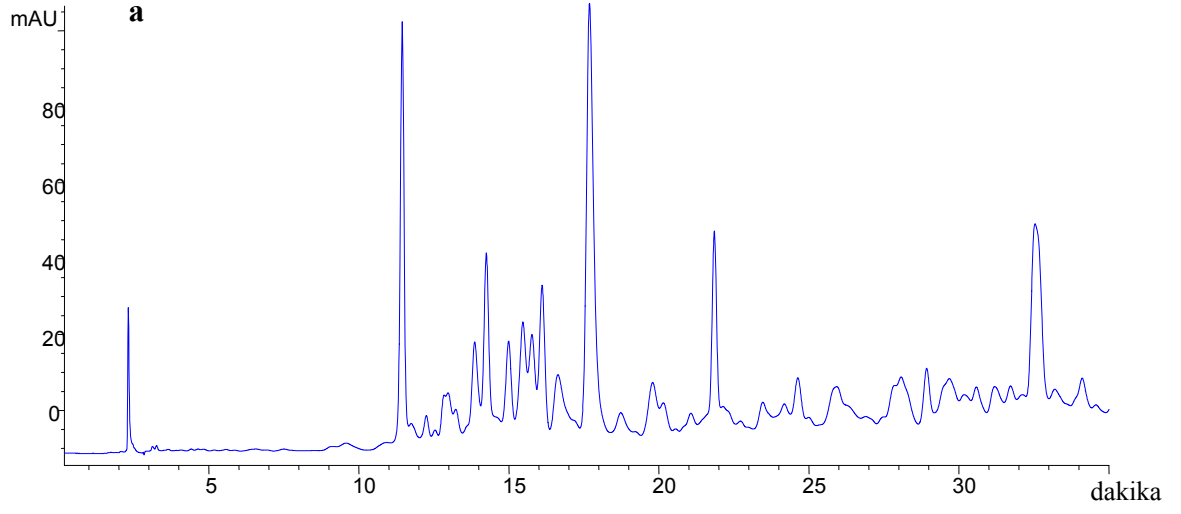
Çizelge 10. Geliştirilen LC-UV metodunun parametreleri

No	RT	Bileşik	%BSS (RT )	% BSS ( Alan )	R <sup>2</sup>	LOD*
1	5,28	Gallik Asit	0,128	0,3371	0,9995	0,1500
2	10,04	Protokatekuik Asit	0,398	0,1482	0,9996	0,2872
3	12,90	Protokatekaldehit	0,217	0,1985	0,9997	0,8958
4	13,21	Gentisik Asit	0,262	0,7360	0,9998	0,1732
5	14,43	p-OH Benzoik Asit	0,283	0,4213	0,9996	0,2449
6	18,44	Vanilik Asit	0,244	0,1581	0,9996	0,2872
7	18,91	Klorogenik Asit	0,252	0,3446	0,9998	0,6652
8	20,28	Kafeik Asit	0,282	0,4434	0,9997	0,2449
9	21,52	Siringik Asit	0,164	0,2554	0,9996	0,1732
10	23,94	Vanilin	0,219	0,1278	0,9999	0,2872
11	27,45	Siringaldehit	0,254	0,1047	0,9995	0,8124
12	27,64	p-Kumarik Asit	0,311	0,4042	0,998	0,2589
13	29,19	Benzoik Asit	0,232	0,2346	0,9996	0,1732
14	31,16	Ferulik Asit	0,227	0,2964	0,9919	0,5679
15	32,73	Sinapik Asit	0,205	0,5688	0,9937	0,1500

\* deteksiyon limiti (ppm)

Ekstraktların fenolik içerikleri 280 ve 315 nm’de optimize edilen koşullarda yürütülerek incelendi. Her iki dalga boyu ile veriler standartlara göre alıkonma zamanları ve dalga boyuna göre davranışları açısından iki boyutlu olarak incelendi. 6 ekstrakta ait 280 nm ve 315 nm’deki kromatogramlar verilmiştir. Örnek olması açısından LYSX’e ait kromatogramlar Şekil 15’de verilmiştir.





Şekil 15. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LYSX' e ait kromatogramlar

Ekstraktlarda tespit edilen fenolik standartların ppm cinsinden miktarları Çizelge 11 'de verilmiştir.

Çizelge 11. Ekstraktlarda gözlenen standartların ppm cinsinden konsantrasyonları.

Standartlar	LYSX	LYSC	LKSX	LKSC	LG SX	LGSC
Gallik Asit	-	-	-	-	-	95,87
Protokatekuik Asit	-	-	-	-	-	-
Protokatekaldehit	1,1	-	2,2	1,45	-	-
Gentisik Asit	-	-	-	-	-	-
p-OH Benzoik Asit	-	-	-	-	-	-
Vanillik Asit	-	-	9,4	-	-	-
Klorojenik Asit	127,1	177,6	80,6	56	60,3	-
Kaffeik Asit	-	18,47	-	-	-	-
Siringik Asit	-	-	45	-	-	-
Vanillin	-	-	-	-	-	-
Siringaldehit	-	-	-	-	-	-
p-Kumarik	-	-	-	-	-	-
Benzoik Asit	-	-	442,3	90,1	-	-
Ferulik Asit	-	-	-	-	-	-
Sinapik Asit	-	-	-	-	-	-

- : İlgili standart gözlenmedi

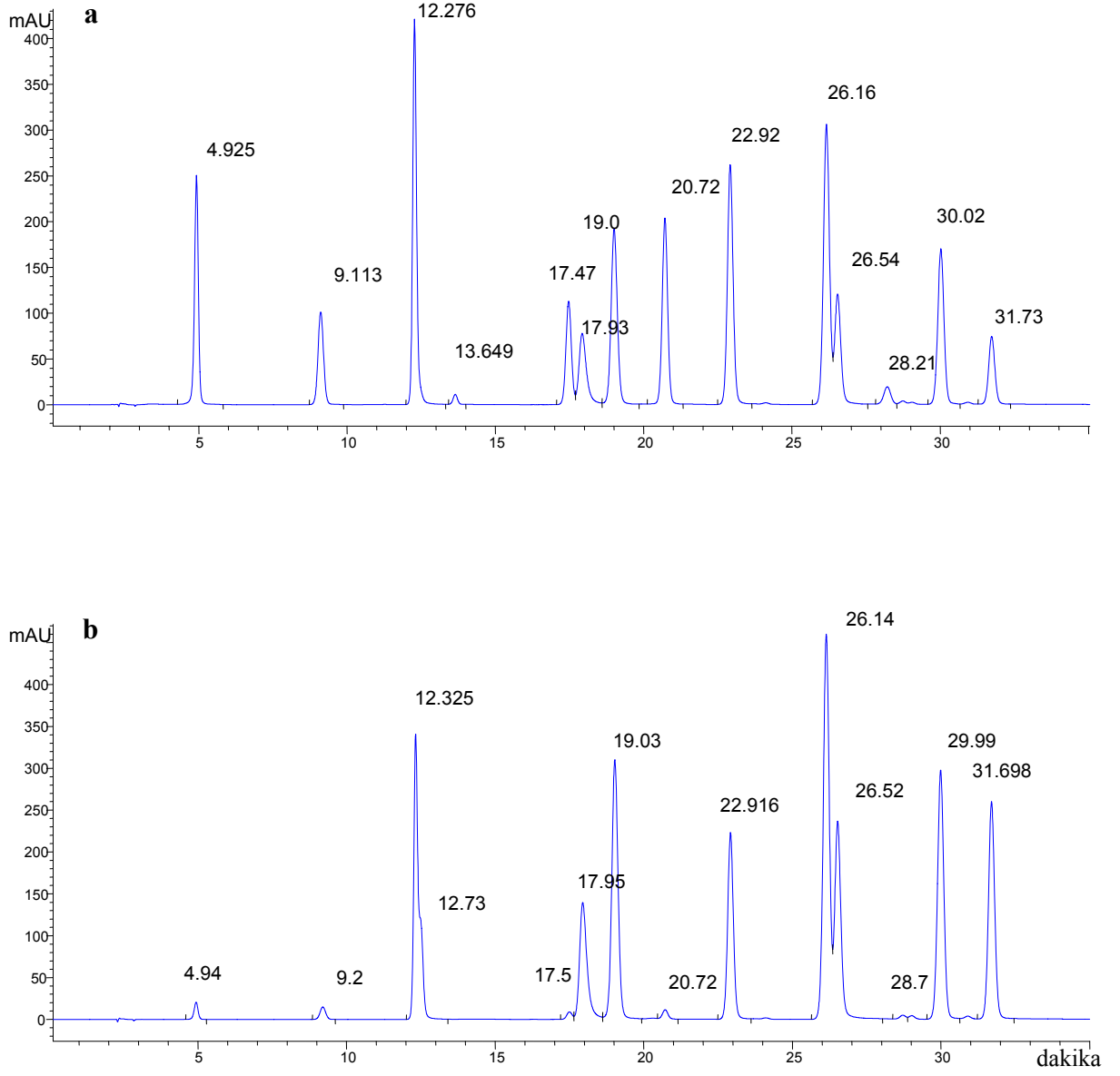
Fenolik bileşik içeriği araştırılan ekstraktların LC-UV kromatogramlarının oldukça kalabalık çıkmasından dolayı kullanılan çözücü sisteminde yeterli pik çözünürlüğü elde edilemedi. Fenolik asitlere yönelik yapılabilecek seçimli bir ekstraksiyonun ardından daha temiz kromatogramlar elde etmek için uygun bir yöntem seçildi. Yukarıda “Ekstraktlardan fenolik bileşiklerin sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonu” başlığı altında tanımlanan bu yöntem önce kullanılan 15 fenolik standarda uygulanarak geri kazanım hesaplandı (Çizelge 12). Bu yöntemle 15 standart için genel olarak mantıklı aralıkta geri kazanımlar elde edilmiştir.

Çizelge 12. 15 Fenolik standardın ekstraksiyonlarının % geri kazanımları.

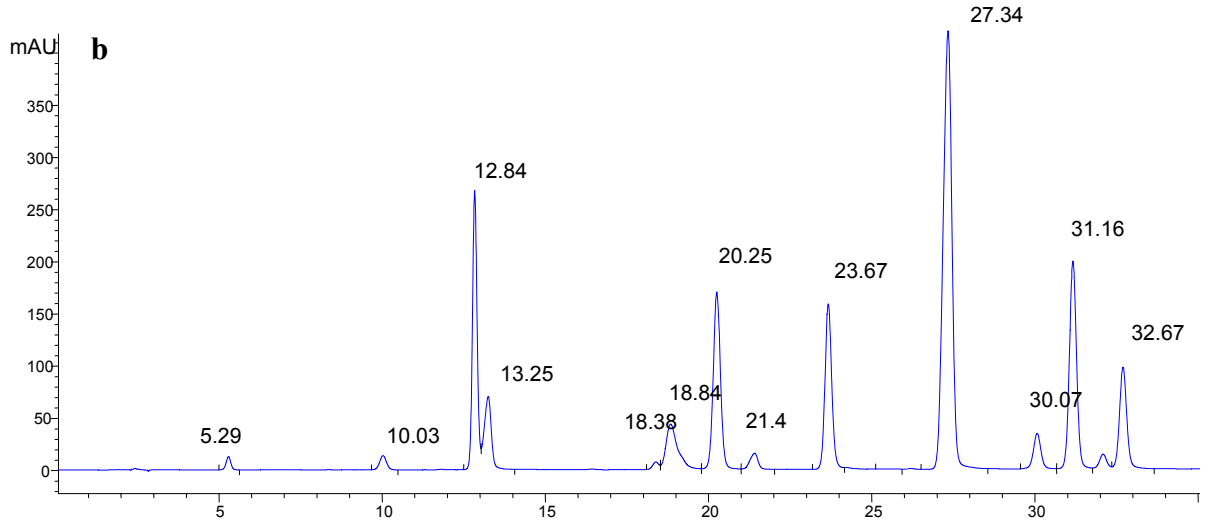
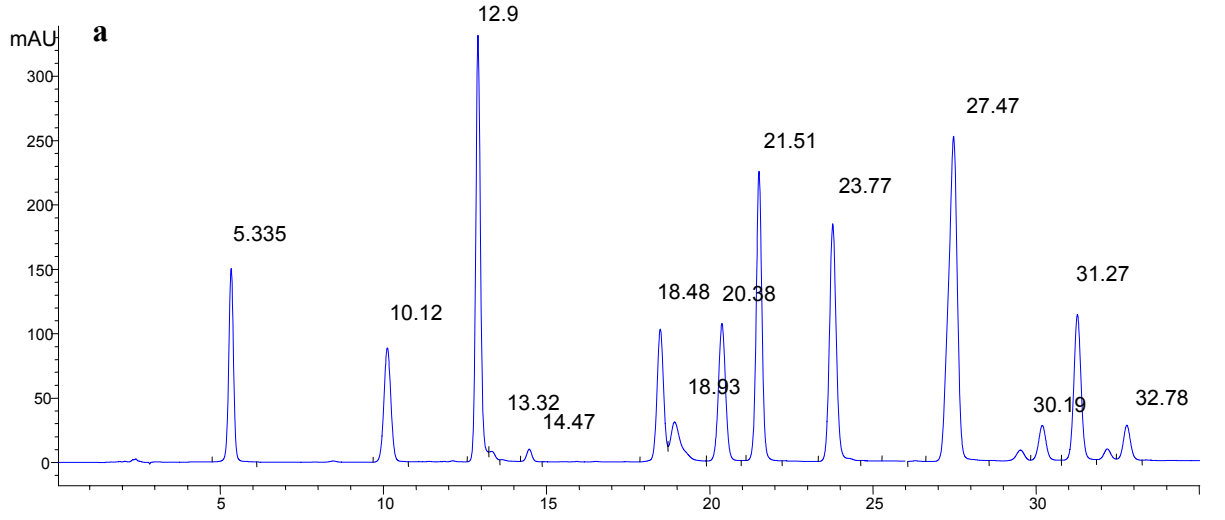
Bileşik No	Bileşik Adı	% Geri Kazanım
1	Gallik asit	65,76
2	Protokatekuik asit	98,8
3	Protokatekaldehit	84,69
4	Gentisik asit	100
5	p-OH benzoik asit	100
6	Vanilik asit	98,98
7	Klorogenik asit	44,54
8	Kafeik asit	57,33
9	Siringik asit	100
10	Vanilin	75,86
11	Siringaldehit	-*
12	p-Kumarik asit	-*
13	Benzoik asit	100
14	Ferulik asit	69
15	Sinapik asit	40

\*: Siringaldehit ile p-Kumarik asit ekstraksiyondan sonra girişim yaptıklarından geri kazanımları hesaplanamadı.

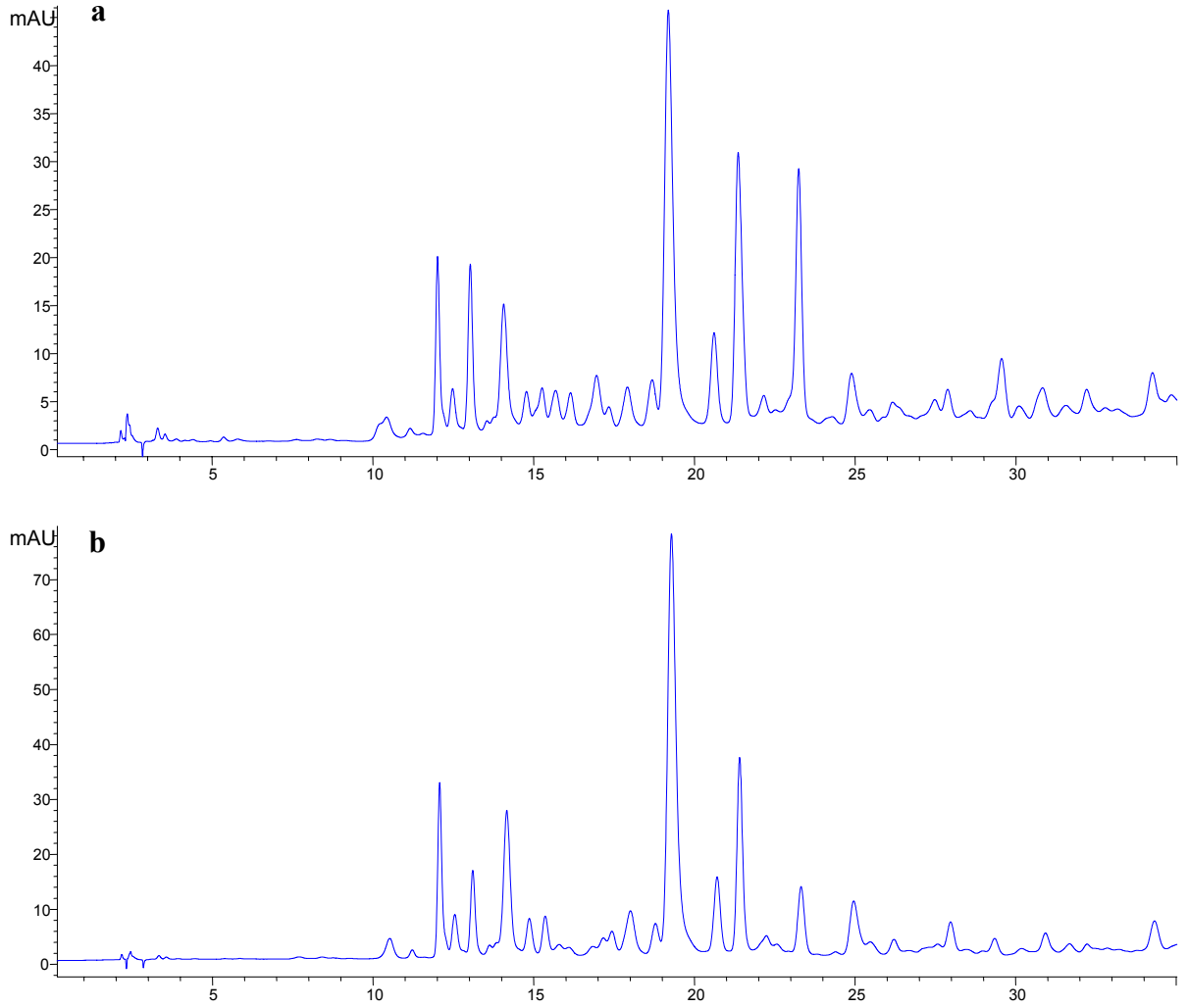
Seçimli ekstraksiyon öncesi elde edilen fenolik standartlara ait LC-UV kromatogramı Şekil 16'da, seçimli ekstraksiyondan sonraki kromatogram ise Şekil 17'de verilmiştir. Yine örnek olması açısından, seçimli ekstraksiyondan sonra elde edilen LYSX ekstraktına ait LC-UV kromatogramı Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 16. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Her bir standardın konsantrasyonu 50 ppm'dir.



Şekil 17. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyondan sonra fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Her bir standardın ekstraksiyona başlangıç konsantrasyonu 50 ppm'dir.



Şekil 18. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon. sonrasında LYSX'e ait kromatogramlar

Seçimli ekstraksiyondan sonra, ekstraktların LC-UV kromatogramlarında gözlenen fenolik standartların ppm cinsinden konsantrasyonları Çizelge 13'de verilmiştir.

Çizelge 13. Seçimli ekstraksiyon sonrası fenolik standartların ppm cinsinden Konsantrasyonları

Standartlar	LYSX	LYSC	LKSX	LKSC	LG SX	LGSC
Gallik Asit	0,1	0,86	-	0,2	-	1
Protokatekuik Asit	-	-	0,7	0,8	-	3,3
Protokatekaldehit	2,5	-	0,8	0,9	-	1,86
Gentisik Asit	-	-	-	-	-	-
p-OH Benzoik Asit	-	-	-	-	-	179,5
Vanillik Asit	-	-	-	-	-	-
Klorojenik Asit	53,5	75,6	30,6	26,9	-	-
Kaffeik Asit	-	17	-	-	-	-
Siringik Asit	-	-	-	-	-	-
Vanillin	-	-	-	-	-	3,1
Siringaldehit	-	2,75	-	-	-	1,7
p-Kumarik	2,9	-	-	-	-	-
Benzoik Asit	17,2	-	-	33,5	-	-
Ferulik Asit	-	1,94	-	-	-	-
Sinapik Asit	-	-	-	-	-	-

- : İlgili standart gözlenmedi

Çizelge 11 ve Çizelge 13'e fenolik bileşik içerikleri açısından bakıldığında ekstraktların süper kritik ekstraksiyon yöntemi ve Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen fenolik bileşik içerikleri ve konsantrasyonlarının rasgele bir dağılım sergilemekte olduğu gözlenmektedir. Ekstraktlarda en yaygın ve miktar olarak en fazla klorojenik asit gözlenmiştir. Gallik asit de klorojenik asitten sonra en yaygın olarak gözlenen fenolik asittir. Seçimli ekstraksiyondan sonra gallik asidin ekstraktlarda daha yüksek oranda gözlenmesi klorojenik asidin seçimli ekstraksiyondaki geri kazanılabilirliğinin gallik asitten daha düşük olmasına bağlanmıştır (değerler sırasıyla % 44,54 ve % 65,76 dır). İncelenen standartlardan siringik asit, vanillik asit, gentisik asit ve sinapik asit, ekstraktlarda kullanılan mevcut yöntemle gözlenmemiştir.

Çizelge 11 ve Çizelge 13'e, uygulanan seçimli ekstraksiyon açısından karşılaştırmalı olarak bakıldığında genel olarak pik boylarında ekstraksiyonun ardından düşüş gözlenmiştir ki bu Çizelge 12'e göre beklenen bir sonuçtur. Ekstraktların sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonları içeriklerindeki standartların miktarlarında azalma gözlenmesinden dolayı dezavantajlı olarak görülse de, kromatogramlarda bazı piklerdeki kuyruklanmanın azalması, daha keskin ve temiz piklerin elde edilmesi gibi avantajlar sunmuştur. Seçimli ekstraksiyondan önce standartlarla aynı zamanda çıkan bazı piklerin yeterince temiz olmamalarından dolayı dalga boylarına göre beklenen değişimler elde edilemediğinden varlıklarından emin olunamazken, seçimli ekstraksiyonun ardından elde edilen temiz pikler bunların varlığını daha net ortaya koymuştur. Ayrıca seçimli ekstraksiyona pH'sı 1 olan HCl çözeltisiyle 15 dakika karıştırılarak başlanması bazı fenolik asit türevlerinin hidrolize uğramalarına sebep olabilir ki buda seçimli ekstraksiyon öncesinde gözlenmeyen bazı standartların ekstraksiyondan sonra gözlenmelerini açıklamaktadır.

Ekstraktların DPPH ve FRAP antioksidan aktivite tayini deneylerinde genelde en iyi sonuçları veren kabuk ve gövde ekstraktlarına bakıldığında, bu ekstraktlarda gözlenip yaprak ekstraktlarında gözlenmeyen fenolik asitler protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanillik asit, siringik asit ve vanillin olarak göze çarpmaktadır. Yaprak ekstraktlarında gözlenip, kabuk ve gövde ekstraktlarında gözlenmeyen fenolik asitler olarak da kafeik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit öne çıkmaktadır. Tüm ekstraktlarda gözlenen klorojenik asidin de en yüksek oranda yaprak ekstraktlarında elde edildiği açıkça görülmektedir. İlginç bir şekilde, kabuk ve gövde ekstraktlarında gözlenip, yaprak ekstraktlarında gözlenmeyen fenolik asitlerin benzoik asit türevi, yaprak ekstraktlarında gözlenip, kabuk ve gövde ekstraktlarında gözlenmeyen fenolik asitlerin ise sinnamik asit türevi oldukları dikkati çekmektedir. Oysa sinnamik asit türevlerinin, benzoik asit türevlerinden daha aktif antioksidan olduklarına dair literatür bilgisi mevcuttur [98,99]. Bu durum da, kabuk ve gövde ekstraktlarının yaprak ekstraktlarından daha iyi antioksidan aktivite göstermelerinin, analizi yapılan fenolik asit bileşiklerinden ziyade, ekstraktlarda bulunması muhtemel diğer bazı antioksidan aktif bileşik gruplarından (özellikle flavonoidler)



kaynaklanabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Ayrıca, ekstraktların 280 nm ve 315 nm’lerde elde edilen kromatogramları oldukça zengin olmasına rağmen fenolik standartlarla nispeten az sayıda pik örtüşmektedir. Kromatogramların mevcut çözücü sisteminde ilk 30 dakika içerisinde zengin olmaları, polar olan ve bu yüzden erkenden çözücü ortamına geçen şeker bağlı flavonoidlerin ekstraktlarda bulunabileceğini göstermektedir.

## **4.2. Kinetik Çalışma Kısmı Ekstraktları Üzerinde Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular**

Parça büyüklüğü, zaman ve çözücü cinsi gibi ekstraksiyon parametrelerinin ekstraktların toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktiviteleri üzerine yaptığı etkileri gözlemleyebilmek için bir dizi çalışma gerçekleştirildi. Bu deneylerde kabuk ve gövde numune miktarlarının yeterli olmaması nedeniyle bitkiye ait yaprak numuneleri kullanılmıştır. Ekstraksiyonlar sadece süperkritik ekstraksiyon tekniği ile gerçekleştirildi.

### **4.2.1. Parçacık büyüklüğünün etkisi**

Parçacık büyüklüğünün etkisini gözlemek amacıyla *Laurocerasus officinalis* Roem. bitki yapraklarının 0-125 µm, 125-250 µm ve 250-500 µm parçacık büyüklüğüne sahip fraksiyonları kullanılarak süperkritik ekstraksiyonlar gerçekleştirildi. Çözücü olarak metanol kullanıldı. Ekstraksiyon süresi 30 dk’ya, sıcaklık 245,1 °C’ye sabitlendi.

Parça büyüklüğünün etkisini incelemek amacıyla yapılan ekstraksiyonlarda, elde edilen ekstraksiyon verimleri Çizelge 14’de verilmiştir.

Çizelge 14. Parça büyüklüğünün etkisi deneylerinde elde edilen ekstraksiyon verimleri (% , kuru orijinal numune üzerinden)

Kullanılan Numune Boyutu ( $\mu\text{m}$ )	Ekstraksiyon verimi
0<L*<125	25,97
125<L<250	29,02
250<L<500	27,16

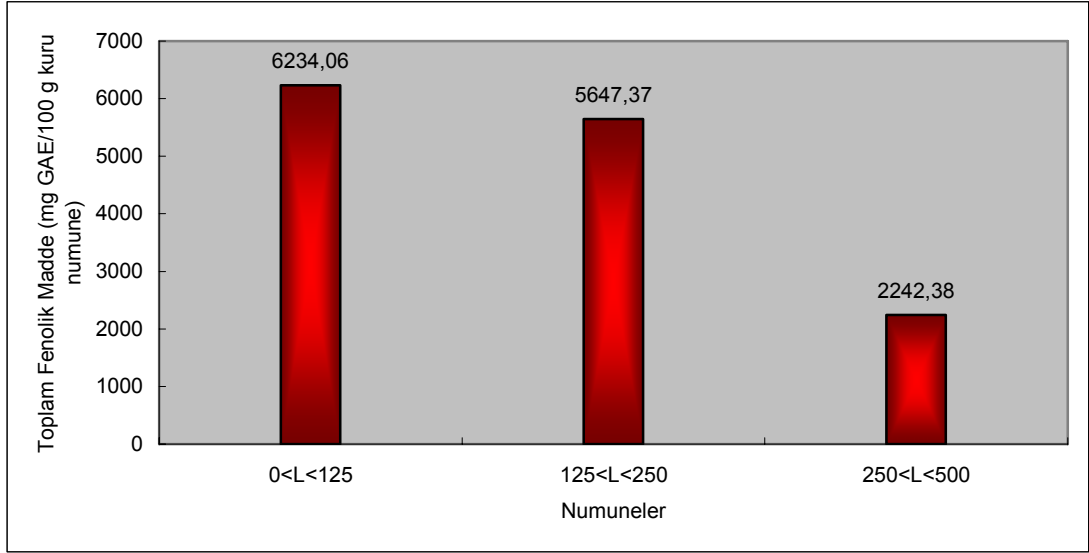
\* L = *Laurocerasus* için 0-125 $\mu\text{m}$  parçacık büyüklüğüne sahip yaprak numunesi

Çizelge 14, bitkiye ait en yüksek ekstraksiyon veriminin 125-250  $\mu\text{m}$  parçacık boyutuna sahip numune kullanıldığında ulaşıldığını göstermektedir. *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisine ait yaprak numunelerinde üç parça büyüklüğü için elde edilen ekstraksiyon verimi birbirine yakın sonuçlar vermiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi 125-250  $\mu\text{m}$  parçacık büyüklüğüne sahip *Laurocerasus officinalis* Roem. numunesinden (% 29,02), elde edilmiştir. Aslında daha küçük parçacık boyutunun ekstraksiyon veriminde daha yüksek değerler ortaya koyması beklenir. Ancak ekstraksiyon ortamında yüksek basınçtan dolayı küçük parçacıklar preslenerek katı ve geçirgen olmayan bir tabaka oluşturabilirler. Bu da süperkritik akışkanın tüm numune yapısına etki ederek tam bir ekstraksiyon gerçekleştirmesini engelleyebilmektedir. Bazı araştırmacılar, bu problemin önüne geçebilmek için, numuneyi ekstraksiyon kartuşuna yerleştirmeden önce küresel cam parçacıkları veya kum gibi inert maddelerle karıştırmanın ekstraksiyon verimi üzerine olumlu etkileri olacağını belirtmektedirler [100].

Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivitelerinin, numune parça büyüklüğünden ne şekilde etkilendiklerini belirlemek amacıyla daha “toplam fenolik madde tayini” ve “DPPH radikal temizleme antioksidan aktivitesi” deneyleri daha önce anlatıldığı şekilde bu ekstraktlara da uygulandı. Bu deneylerden elde edilen sonuçlar, Çizelge 15 ile Şekil 19’de verilmiştir.

Çizelge 15. Parçacık büyüklüğünün toplam fenolik madde içeriğine etkisi deneylerinden elde edilen bulgular (mg GAE/100 g kuru numune)

Ekstrakt	Toplam Fenolik Madde
0<L<125	6234,06
125<L<250	5647,37
250<L<500	2242,38

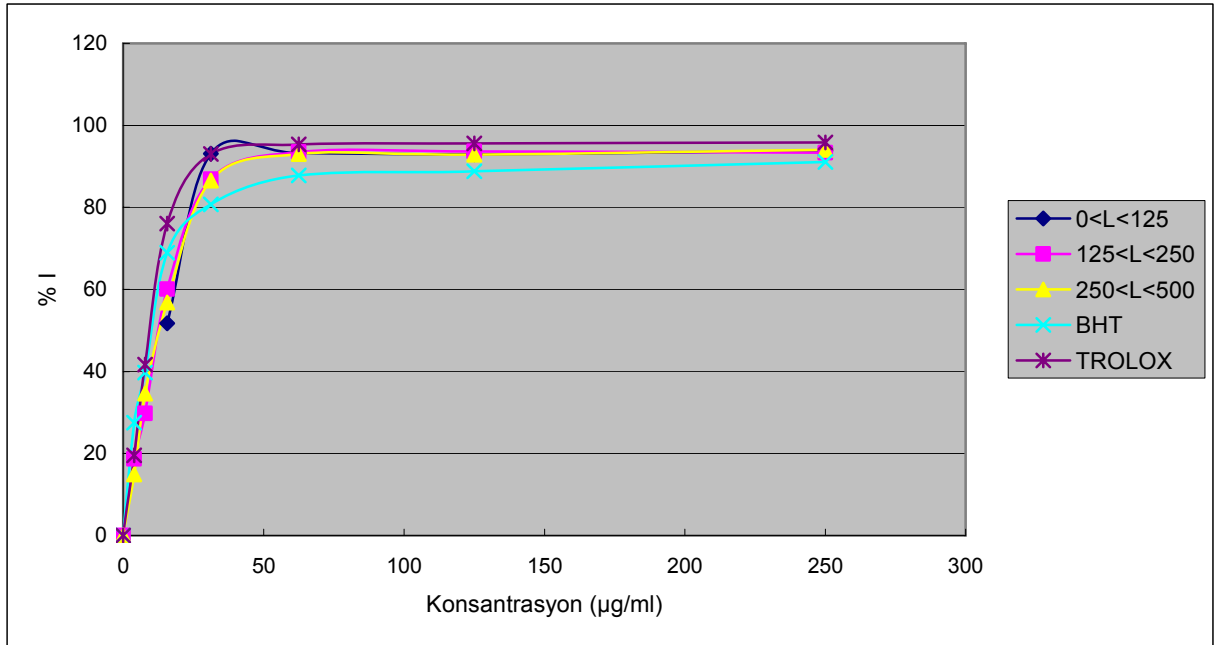


Şekil 19. Parçacık büyüklüğünün toplam fenolik madde içeriğine etkisi

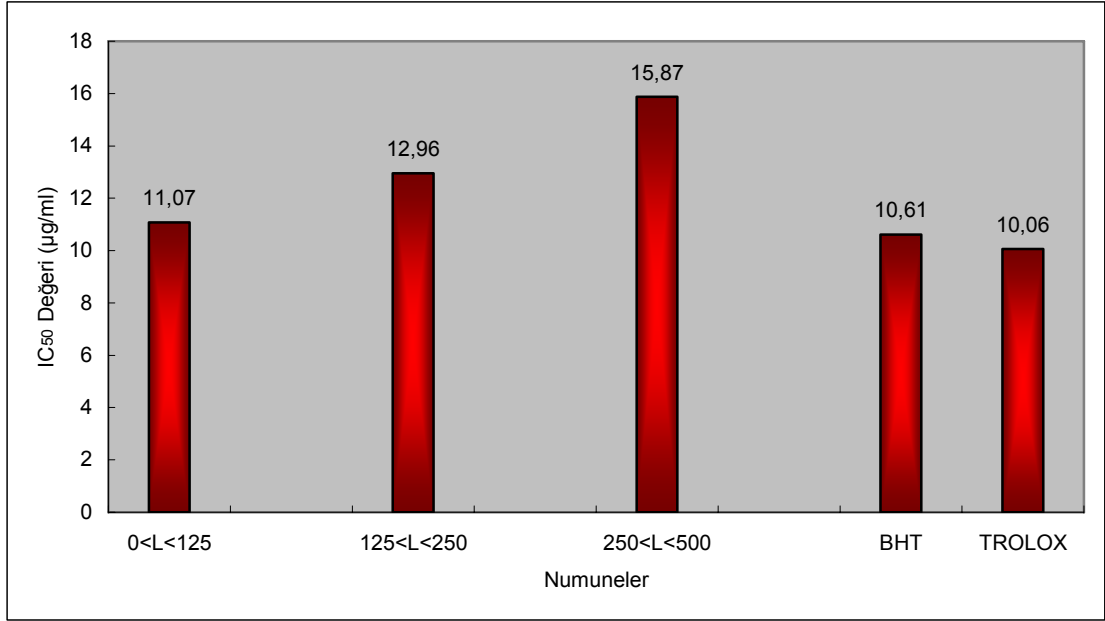
Çizelge 15 ve Şekil 19, *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisine ait numunelerde parça büyüklüğü arttıkça ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerinin düştüğünü göstermektedir. Ancak bu değerlerin 0<L<125 numunesi hariç ekstraksiyon verimleri ile uyumlu olduğunu söylenebilir. Yani ekstraksiyon verimi yükseldikçe toplam fenolik madde değeri de yükselmekte, düştükçe düşmektedir.

Çizelge 16. Parça büyüklüğünün etkisi deneylerinde, ekstraktların DPPH radikal temizleme antioksidan aktivitesi deneylerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri

Ekstrakt	IC <sub>50</sub> değerleri (µg/ml)
0<L<125	11,07
125<L<250	12,96
250<L<500	15,87
BHT	10,61
TROLOX	10,06



Şekil 20. *Laurocerasus officinalis* Roem bitkisine ait farklı parçacık büyüklüğündeki numunelerden elde edilen ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri.



Şekil 21. Parçacık büyüklüğünün ekstraktların antioksidan aktiviteleri üzerine etkisi.

Ekstraktların DPPH radikal temizleme antioksidan aktivitesi deneylerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında (Çizelge 15, Şekil 20, ve Şekil 21), *Laurocerasus officinalis* Roem bitkisi için 0-125 ve 125-250 µm parça büyüklüğündeki numunelerin hem birbirlerine hem de karşılaştırma maddeleri olan BHT ve TROLOX'a yakın IC<sub>50</sub> değerleri sergiledikleri görülmektedir. Ancak, 250-500 µm'lik numunelerden elde edilen değerler, açıkça daha yüksek değerlerdir (düşük olması daha iyi). Bu da parçacık boyutunun 250 µm'yi geçmesi halinde ekstraktların antioksidan aktivitelerinin düştüğünü göstermektedir. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ile birlikte bir karşılaştırma yapıldığında da, toplam fenolik madde içerikleri ile sergilenen IC<sub>50</sub> değerleri arasında uyum olduğu gözlenmektedir. *Laurocerasus officinalis* Roem. numunelerinde parça büyüklüğü arttıkça toplam fenolik madde miktarı azalmakta, buna paralel olarak da antioksidan aktivite düşmektedir. Ekstraktların parçacık büyüklüğü ile antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki aşağıda ayrı bir başlık altında ayrıntılı olarak incelenmiştir.

#### 4.2.2. Ekstraksiyon süresinin etkisi

Ekstraksiyon süresinin, ekstraktların toplam fenolik madde ve antioksidan aktiviteleri üzerine etkisini gözlemek amacıyla yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Çizelge 17 ve 18 ile Şekil 22’de verilmiştir. Deneylerde 125-250 µm parça boyutundaki numuneler ve çözücü olarak da metanol kullanıldı. Ekstraksiyon sıcaklığı 245,1 °C olarak seçildi.

Çizelge 17. Ekstraksiyon süresinin etkisi deneylerinde elde edilen ekstraksiyon verimleri (% , kuru orijinal numune üzerinden)

Ekstraksiyon süresi (dk)	Ekstraksiyon verimi
L15*	25,77
L30	29,02
L45	25,78

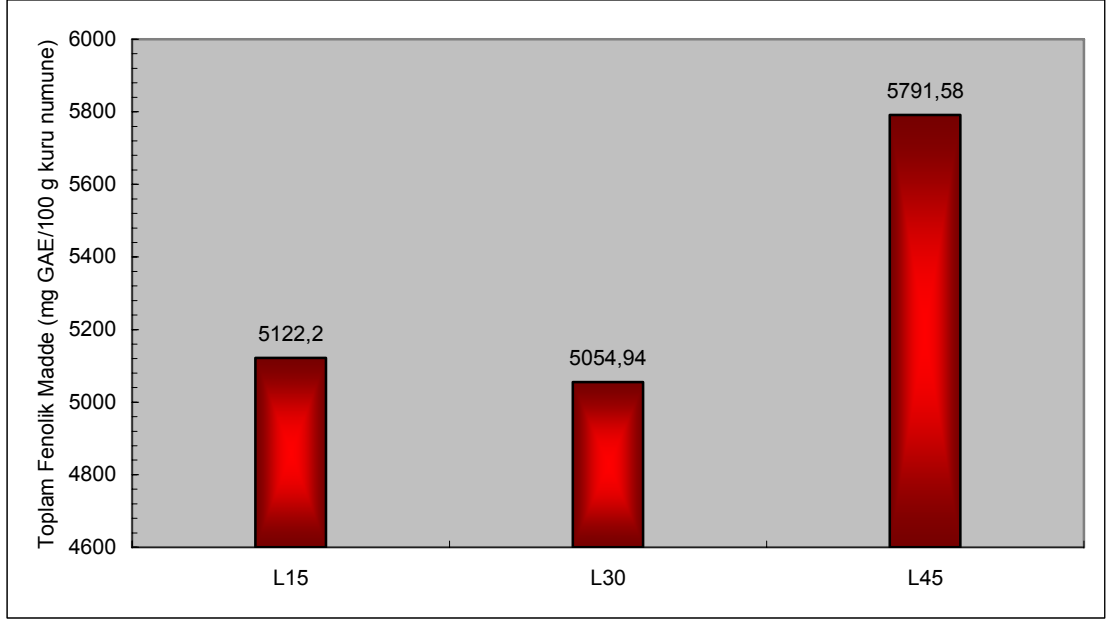
\* L15 = *Laurocerasus* için 15 dk ekstraksiyon süresi

Çizelge 17’den *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisi için ekstraksiyon süresinin artmasıyla birlikte verimin önce arttığı, fakat 30 dk’lık ekstraksiyondan daha uzun sürelerde verimin düştüğü gözlenmektedir. Ekstraksiyon zamanının toplam fenolik madde içeriğine etkisi deneylerinde elde edilen bulgular Çizelge 18’de, bu değerlerden çizilen grafik ise Şekil 22’de verilmiştir.

Çizelge 18 . Ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde içeriğine etkisi (mg GAE/100 g kuru numune)

Ekstrakt	Toplam Fenolik Madde
L15*	5122,20
L30	5647,37
L45	5791,58

\* L15 = *Laurocerasus* için 15 dk ekstraksiyon süresi



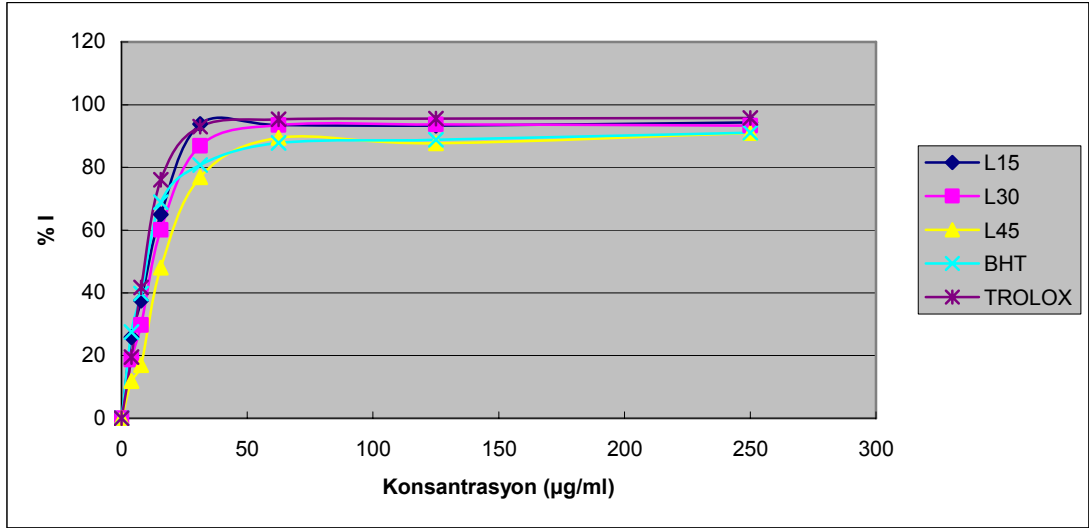
Şekil 22 . Ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde içeriğine etkisi

Çizelge 18 ve Şekil 22'den, ekstraksiyon süresi uzadıkça elde edilen toplam fenolik madde miktarının da arttığı açıkça görülmektedir. Ekstraksiyon verimleri ile elde edilen toplam fenolik madde miktarları paralel olarak artmaktadır. Genel olarak *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinden elde edilen ekstraktların, fenolik madde içeriği açısından zengin oldukları söylenebilir.

Ekstraksiyon süresinin, ekstraktların antioksidan aktiviteleri üzerine etkilerini incelemek için hazırlanan Çizelge 19, Şekil 23 ve 24 aşağıda verilmiştir.

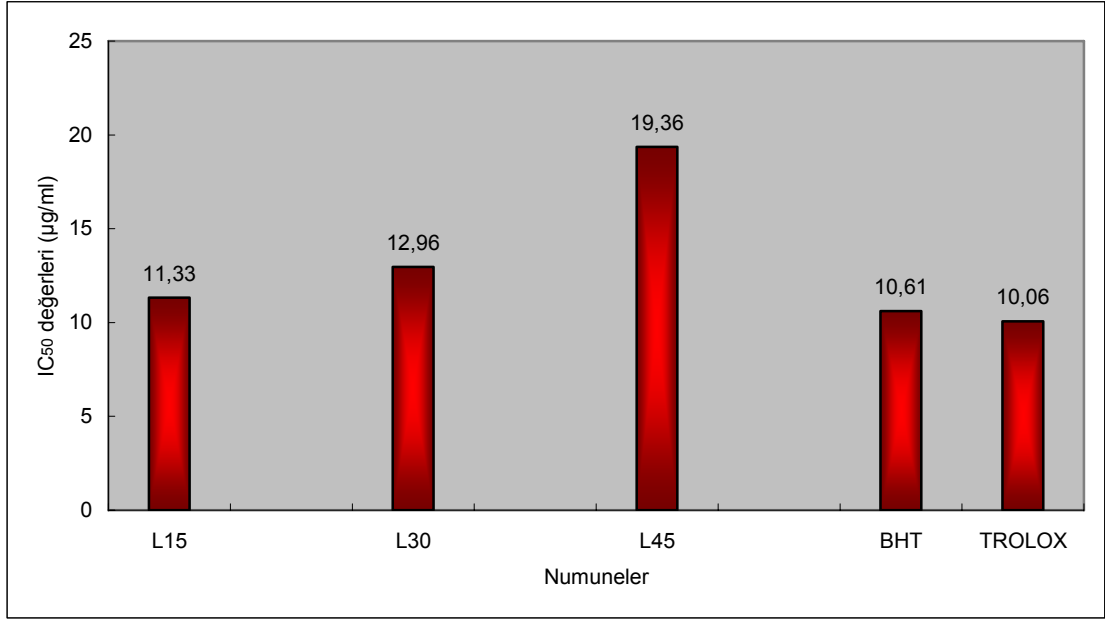
Çizelge 19 . Ekstraksiyon süresinin etkisi deneylerinde, ekstraktların DPPH radikal temizleme antioksidan aktivitesi deneylerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri

Ekstrakt	IC <sub>50</sub> değerleri (µg/ml)
L15	11,33
L30	12,96
L45	19,36
BHT	10,61
TROLOX	10,06



Şekil 23. *Laurocerasus officinalis* Roem bitkisine ait farklı ekstraksiyon sürelerinde numunelerden elde edilen ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri





Şekil 24. Ekstraksiyon süresinin, ekstraktların antioksidan aktiviteleri üzerine etkisi

Çizelge 19, Şekil 23 ve 24'ten de görüldüğü üzere, ekstraksiyon süresi uzadıkça ekstraktların antioksidan aktivitelerinde belirgin bir düşüş meydana gelmektedir. Bu düşüş özellikle ekstraksiyon süresi 30 dk'yı geçtiğinde daha da belirgin hale gelmektedir. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ile bir karşılaştırma yapıldığında, ekstraksiyon süresi uzadıkça ekstraktların toplam fenolik madde miktarları artmakta, fakat antioksidan aktiviteleri düşmektedir. Bu durum ise aşırı uzun ekstraksiyon süresinin, ekstraktların antioksidan aktivitelerini olumsuz etkilediğini ortaya koymaktadır. Muhtemelen, ekstraksiyon süresi uzadıkça, aşırı yüksek sıcaklık ve basıncın etkisiyle, ekstraksiyon ortamındaki, sıcaklık ve basınca duyarlı olan antioksidan aktiviteleri yüksek bazı bileşik grupları, bu etkilerini kaybetmektedir. Diğer bir ihtimal de, antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşik gruplarının ekstraksiyonun ilk anlarında, antioksidan aktivitesi düşük olan bileşik gruplarının ise ekstraksiyonun ilerleyen aşamalarında çözücüye geçmekte oldukları düşüncesidir. Ortamın sıcaklık ve basıncının yüksekliği düşünülürse, lignoselülozik yapının özellikle lignin kısmındaki parçalanmalar sonucu çözücüye geçebilecek fenolik yapılı, fakat antioksidan aktiviteleri düşük bileşik gruplarının da bu etkiye

sebepler olabilecekleri gözardı edilmemelidir. Yüksek sıcaklık ve basıncın, bitkisel materyallerdeki lignin yapısına etki ederek,  $\alpha$  ve  $\beta$  eterik bağlarının bozunmasını ve karbon-karbon bağlarının parçalanmasını içeren bir dizi reaksiyon neticesinde çözünür ve gaz halindeki bir takım ürünlerin oluşumuna neden olduğu ve bu ürünlerin de özellikle homolitik parçalanmalar sonucu ortaya çıkan radikal türler içerdiği bilinmektedir [101]. Oluşan bu radikal türler, çözelti ortamına geçen antioksidan aktivitesi yüksek fenolik bileşiklerle etkileşerek kararlı hale gelebilirler. Bu da, ekstraktların antioksidan aktivitelerinin düşmesine sebep olabilecek bir diğer husustur.

*Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinden elde edilen ekstraktlar toplam fenolik madde içerikleri ile doğrusallık göstermektedir.

#### 4.2.3. Ekstraksiyon çözücüsünün etkisi

Bu deneylerde, 0-125  $\mu$ m parça büyüklüğüne sahip numuneler kullanıldı. Ekstraksiyon süresi 30 dk olarak sabitlendi. Ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol, etil asetat ve n-hekzan kullanıldı. Tüm ekstraksiyonlarda ekstraksiyon sıcaklığı kullanılan çözücülerin süperkritik nokta sıcaklıklarının yaklaşık 5 °C üzerine sabitlendi (metanol için 245,1 °C, etil asetat için 255 °C ve n-hekzan için 239,4 °C). Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri Çizelge 20’de verilmiştir.

Çizelge 20. Çözücünün etkisi deneylerinde elde edilen ekstraksiyon verimleri (% kuru orijinal numune üzerinden)

Ekstraksiyon çözücüsü	Ekstraksiyon verimi
LM*	25,97
LE	8,93
LH	1,92

\* LM: *Laurocerasus officinalis* Roem numunesin metanolla, LE: *Laurocerasus officinalis* Roem numunesin etanolla, LH: *Laurocerasus officinalis* Roem numunesin hegzanla elde edilen ekstraksiyonları.

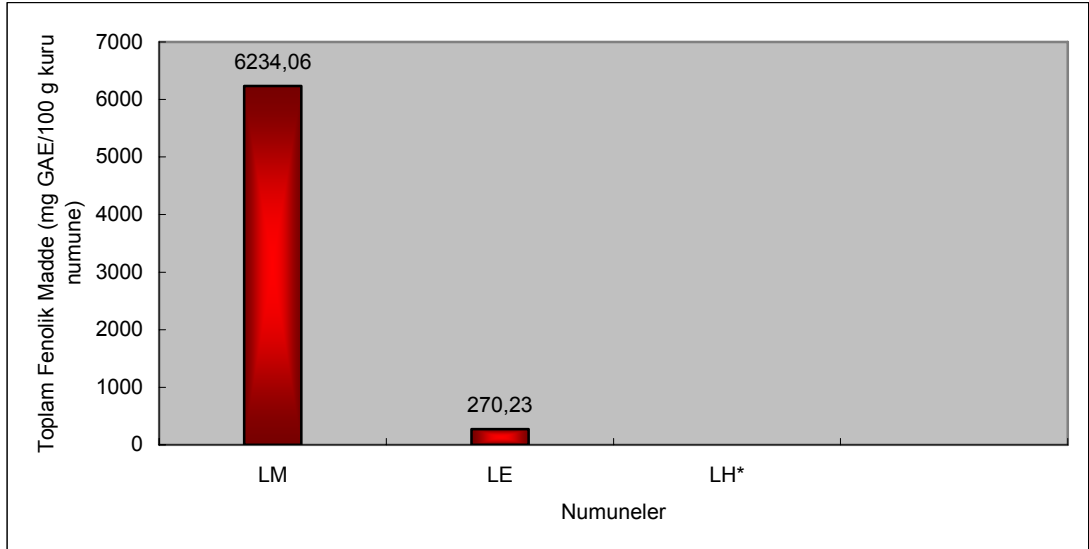
Çizelge 20'e bakıldığında, metanol ekstraksiyonlarının en yüksek verime sahip ekstraktlar olduğu ortadadır. Onu sırasıyla etil asetat ve n-hekzan izlemektedir. Kullanılan çözücünün polaritesi düştükçe, ekstraksiyon verimi de büyük oranda düşmektedir. Bu zaten beklenen bir sonuçtur.

Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri Çizelge 21'de, bu değerlerden çizilen grafik ise Şekil 25'de gösterilmiştir.

Çizelge 21. Çözücü etkisi deneylerinde elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)

Ekstrakt	Toplam Fenolik Madde
LM	6234,06
LE	270,23
LH	TE*

\* Tayin edilemedi



Şekil 25. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (\**Laurocerasus officinalis* Roem bitkisi için hekzan ekstraktlarında toplam fenolik madde tayini yapılamadı)

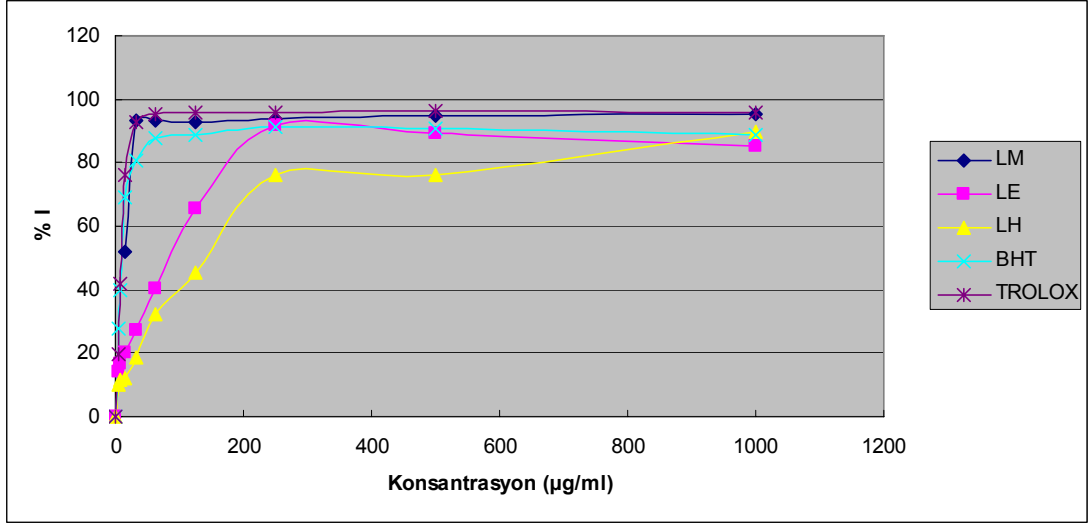
Metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri diğer çözücülerle kıyaslanamayacak ölçüde yüksek olduğu Çizelge 21 ve Şekil 25’den görülmektedir. Etil asetat ekstraktlarında elde edilen toplam fenolik madde çok daha düşük düzeylerde bulunmuştur. Ancak n-hekzan ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri bu değerlerden çok daha düşük elde edildiğinden, kalibrasyon aralığının dışında kaldı ve hesaplanmadı. Elde edilen bu sonuç, fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda polaritesi yüksek çözücülerin daha iyi sonuç vereceklerine dair literatürde yer alan bilgilerle uyumludur [87].

Ekstraktların antioksidan aktivitelerinin incelenmesi amacıyla hazırlanan Çizelge 22, Şekil 26 ve 27 aşağıda verilmiştir.

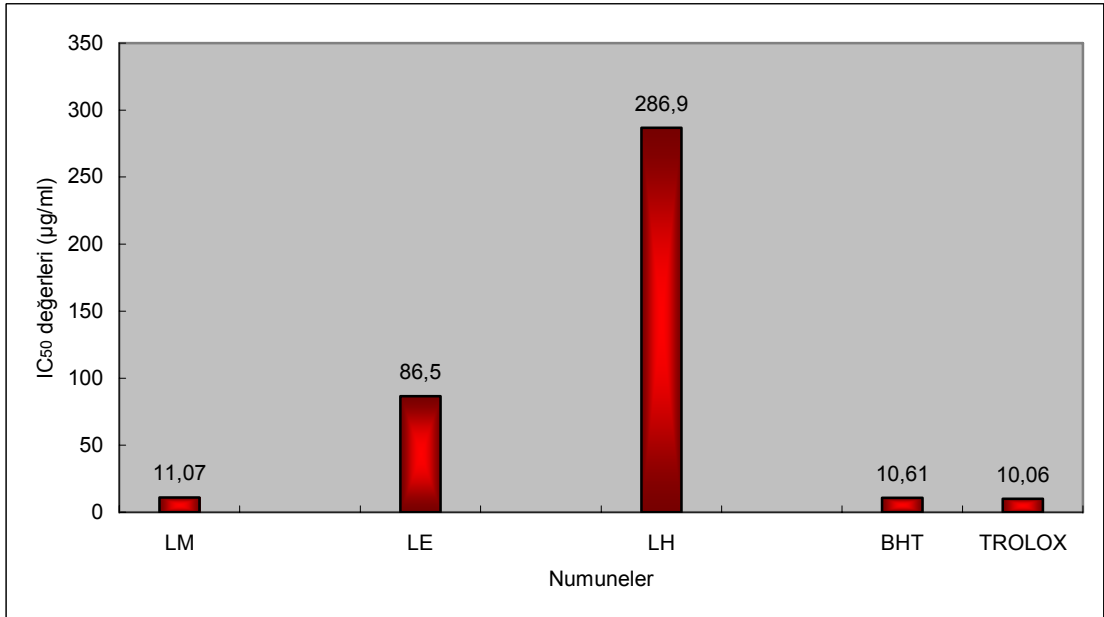
Çizelge 22. Çözücü etkisinin incelendiği deneylerde, ekstraktların DPPH radikal temizleme antioksidan aktivitesi testlerinden elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri

Ekstrakt	IC <sub>50</sub> değerleri (µg/ml)
LM	11,07
LE	86,5
LH	TE*
BHT	10,61
TROLOX	10,06

TE: Tayin edilemedi



Şekil 26. *Laurocerasus officinalis* Roem bitkisine ait farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini temizleme yüzdeleri



Şekil 27. Ekstraksiyon çözücüsünün, ekstraktların antioksidan aktiviteleri üzerine etkisi (\* Hekzan ekstraktlarına ait değerler elde edilemedi)

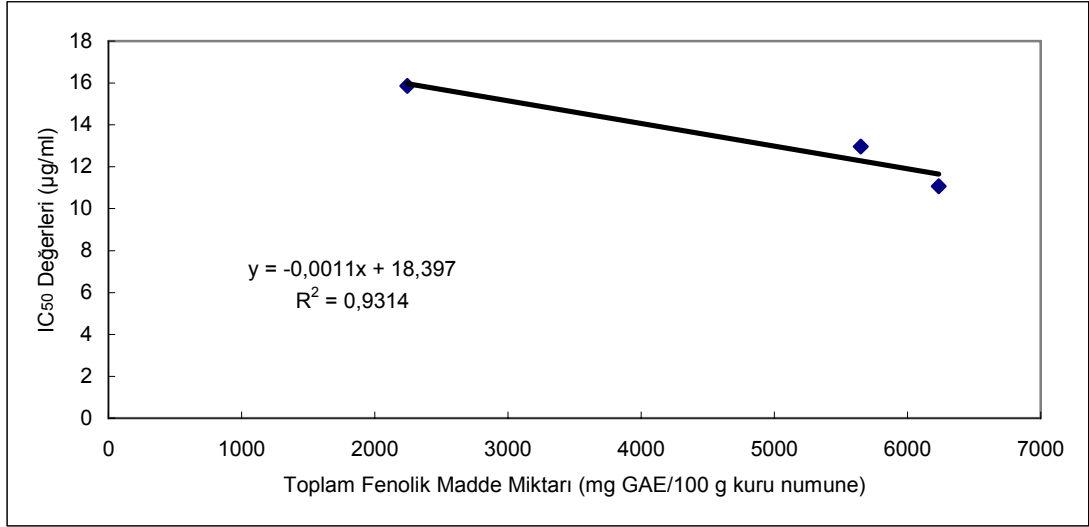
n-Hekzan ekstraktlarının antioksidan etkilerinin çok düşük olduğu özellikle Şekil 26 ve 27'den de görülmektedir. Karşılaştırma maddeleri BHT ve Trolox ile

kıyaslandığında, metanol ekstraktları diğer çözücülerden daha yüksek antioksidan aktivite ortaya koyarlarken, onları etil asetat ekstraktları izledi.

### **4.3. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde İçerikleri ile Antioksidan Aktiviteleri Arasındaki İlişki**

Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla, toplam fenolik madde değerlerine karşı IC<sub>50</sub> değerleri grafiğe geçirildi. Ana çalışma kısmı ekstraktlarından elde edilen değerlerle çizilen grafiklerden, bu iki değer arasında doğrusal bir ilişki elde edilemedi. Bunda en büyük etken, *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinin kabuk ve gövde kısımlarından elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içeriği düşük olmasına karşın ortaya koydukları yüksek antioksidan aktivite değerleridir. Bu durumun, *Laurocerasus officinalis* Roem. için gövde kısımlarından elde edilen ekstraktlarda yer alan fenolik bileşik gruplarının, yapraklardan elde edilen ekstraktlarda yer alan bileşiklerden antioksidan aktivitesi bakımından daha etkili olmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kinetik çalışma kısmında elde edilen değerlerden çizilen grafiklerde ise, bu iki değer arasında doğrusal ilişki, parça büyüklüğünün etkisi deneylerinde ve çözücü etkisi deneylerinde elde edildi. Ekstraksiyon süresinin etkisi deneylerinde ise ters yönde bir doğrusal ilişki elde edildi. Yani ekstraksiyon süresi arttıkça, toplam fenolik madde miktarı da artmakta ancak antioksidan aktivite düşmektedir. Çözücü etkisi deneylerinde, n-hekzan çözücüsü ile elde edilen ekstraktlarda, hem toplam fenolik madde hem de antioksidan aktivite değerleri kalibrasyon aralığı dışına çıktığından sayısal bir değer olarak elde edilemediler. Bu nedenle de toplam fenolik madde-antioksidan aktivite ilişkisi doğrusal olmasına rağmen grafiksel olarak gösterilmediler. Bu ilişki en güzel şekilde, parça büyüklüğünün etkisi deneylerinde gözlemlendi. Bu değerlerden çizilen grafik aşağıda Şekil 28’de verilmiştir.



Şekil 28. *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisi için parçacık büyüklüğünün etkisi deneylerinden elde edilen toplam fenolik madde-antioksidan aktivite ilişkisi grafiği

Toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki pek çok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Bazı araştırmacılar toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasında doğrusal bir ilişki olduğunu söylüyorken [102,96,103], diğer bazı araştırmacılar ise bu iki parametre arasında ya böyle bir ilişkinin olmadığını, ya zayıf bir ilişkinin söz konusu olduğunu ya da bu ilişkinin bu kadar basit olmadığını söylemektedirler [104,105,106,107].

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar her iki düşüncüyü de destekler durumdadır. Örneğin, ana çalışma kısmı ekstraktları ve kinetik çalışma kısmı ekstraktlarından ekstraksiyon süresinin etkisinin incelendiği ekstraktlarda bu ilişki kurulamazken, kinetik çalışma kısmı ekstraktlarından parçacık büyüklüğü ve çözücünün etkisinin incelendiği çalışmalardan elde edilen ekstraktlarda bu pozitif doğrusal ilişki (Şekil 28) elde edilmiştir. Buna göre, bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin tek başına fenolik madde içeriklerine bağlı olmayıp, başka bazı bileşik gruplarından da etkilenebileceğini söyleyebiliriz. Ekstraksiyon şartları da elde edilen ekstraktın bu özelliklerini etkileyebilmektedir. Örneğin, ekstraksiyon süresinin etkisi deneylerinde,

elde edilen toplam fenolik madde miktarı arttıkça, ekstraktların antioksidan aktivitelerinin düşmesi buna en güzel örneklerden birini oluşturmaktadır. Ayrıca, fenolik bileşik gruplarının farklı farklı antioksidan aktivitelerine sahip oldukları, ekstraksiyon ortamında bulunan fenolik bileşiklerle, karbohidratlar ve proteinler gibi diğer bazı bileşik gruplarının antagonistik (etkisini azaltıcı) veya sinerjistik (etkisini artırıcı) bir takım etkileşimlere girebilecekleri de göz önünde bulundurulması gereken hususlardır [106].



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesinin karakteristik bitki türü olan *Laurocerasus officinalis* Roem'un yaprak, kabuk ve gövde kısımlarından, metanol, etil asetat ve n-hekzan gibi çözücülerle Soxhlet ve süperkritik ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri incelendi. Ayrıca en yüksek ekstraksiyon verimi, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitenin elde edildiği ekstraktlar olan metanol ekstraktları üzerinde, içeriğindeki fenolik asitleri belirlemek üzere RP-LC-UV analizleri gerçekleştirildi. Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıdaki başlıklar altında toplanabilir:

-Ana çalışma kısmında ekstraksiyon verimleri genelde yapraklarda diğer kısımlardan daha yüksek olarak elde edildi. Ayrıca kabuk kısımlarında da dikkate değer ölçüde ekstraksiyon verimlerine ulaşıldı. Gövde kısımlarından yapılan ekstraksiyonların verimleri nispeten düşük kaldı. Yaprak kısımlarından elde edilen ekstrakt verimleri % 20,47 - 25,97 arasında; kabuk kısımlarından elde edilen ekstrakt verimleri % 22,97 - 23,07 arasında ve gövde kısımlarından elde edilen ekstrakt verimleri ise % 6,10 – 7,90 arasında bulundu.

-*Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisi için yaprak ve kabuk ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği gövde ekstraktlarından yüksek bulundu. Bu değerler yaprak ekstraktlarında 4313,91 – 6234,06; kabuk ekstraktlarında 5986,37 – 7437,49 ve gövde ekstraktlarında 2228,66 – 3061,58 (mg GAE/100 g kuru numune olarak) arasında elde edildi. Buradan *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinin kabuk ekstraktlarının, fenolik madde içeriği açısından daha zengin olduğu söylenebilir.

-Bitkinin tüm kısımlarından elde edilen ekstraktlar oldukça yüksek antioksidan aktivite değerleri ortaya koydu. DPPH radikal temizleme antioksidan aktivitesi ölçümlerinde, IC<sub>50</sub> değerleri yaprak ekstraktlarından 11,07 – 11,20 µg/ml; kabuk ekstraktlarından 9,55 – 11,39 µg/ml ve gövde ekstraktlarından 8,05 – 9,32 µg/ml

arasında elde edildi. Genel olarak kabuk ekstraktlarının daha iyi sonuçlar ortaya koyduğu gözlemlendi. Bu testlerde *Laurocerasus officinalis* Roem.'in gövdesinden hem Soxhlet hem de süperkritik ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktlarda da toplam fenolik madde içerikleri oldukça düşük olmalarına karşın, karşılaştırma maddeleri olan BHT ve Trolox'tan (sırasıyla 10,61 ve 10,06 µg/ml) daha iyi değerler elde edildi. Fe-III iyonu indirgeme gücü antioksidan aktivitesi (FRAP) deneylerinden de karşılaştırma maddesi olan Trolox (179 µM) ile kıyaslandığında oldukça iyi sonuçlar elde edildi. Ekstraktların FRAP değerleri yaprak ekstraktlarında 88–102 µM; kabuk ekstraktlarında 133-176 µM ve gövde ekstraktlarında ise 128-168 µM arasında elde edildi. Bu testlerde kabuk ve gövde ekstraktları, yaprak ekstraktlarından daha yüksek antioksidan etki ortaya koydular. Buradan bitkinin kabuk ve gövde kısımlarından elde edilen ekstraktların da yüksek antioksidan potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir.

-Ekstraktlar, içeriklerindeki fenolik asitleri belirlemek açısından 15 standart fenolik asit kullanılmak suretiyle RP-LC-UV analizine tabi tutuldular. Sonuçta ekstraktlarda en fazla klorojenik asidin, daha sonra da gallik asidin bulunduğu gözlemlendi. Seçimli ekstraksiyon öncesi gallik asidin ekstraktlardaki konsantrasyonu 95,87 ppm, klorojenik asidin konsantrasyonu ise 56-177,6 ppm arasında değiştiği bulundu. Araştırılan 15 fenolik asit standardından sadece gentisik asit, protokatekuik asit, ferulik asit, sinapik asit, p-OH benzoik asit, vanillin, siringaldehit, p-kumarik ve sinapik asit ekstraktlarda gözlenmemiştir.

-Ekstraktların antioksidan aktiviteleri yüksek olan kabuk ve gövde ekstraktlarında gözlenen fenolik asitler, antioksidan aktivitesi görece düşük bulunan yaprak ekstraktlarında gözlenen fenolik asitlerden daha düşük antioksidan aktif bileşiklerden oluşmaktadır. Buradan, ekstraktların antioksidan aktivitelerinin sadece fenolik bileşiklere bağlı olmadığı, başka bazı bileşik grupları ve etkileşimlerin bu özelliğe olumlu ya da olumsuz katkı yaptıkları söylenebilir.

-Parçacık boyutunun ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivitelerine etkisi gözlemlendi. *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinde parçacık büyüklüğü arttıkça ekstrakte olan toplam fenolik madde miktarı düşmekte, buna paralel olarak da antioksidan aktiviteler de düşmektedir.

-Ekstraksiyon süresi uzadıkça, ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerinde bir artış olmakta, ancak antioksidan aktivite değerleri buna ters olarak düşmektedir. Özellikle 30 dk'lık ekstraksiyon sürelerinden sonra bu etki daha fazla hissedilmektedir. Bu durum, uzayan ekstraksiyon sürelerinde ortamdaki antioksidan aktif bileşiklerin aşırı yüksek sıcaklık ve basıncın etkisiyle bu özelliklerini kaybetmeleri, antioksidan aktif bileşiklerin, ekstraksiyonun erken aşamalarında çözelti ortamına geçmeleri ya da sıcaklık ve basıncın etkisiyle özellikle lignin yapısının parçalanması sonucu ortaya çıkan radikalik türlerin, ortamdaki antioksidan aktivite gösterebilen bileşikleri etkisiz hale getirmesi gibi sebeplere atfedilmiştir.

-Ekstraksiyonda kullanılan çözücü, fenolik yapılu bileşiklerin eldesinde önemli bir parametre olarak gözlemlendi. Diğer çözücülere oranla daha polar bir yapısı olan metanol ile elde edilen ekstraktların, hem toplam fenolik madde içerikleri hem de antioksidan aktiviteleri diğer çözücülerle (etil asetat ve n-hekzan) elde edilenlerden açık ara daha yüksek bulundu. Bu da bu tür bileşiklerin ekstraksiyonunda polar yapılu çözücü ve çözücü sistemlerinin daha etkili sonuçlar vereceğini ortaya koymaktadır. Ancak, polaritesi daha düşük olan etil asetat ekstraktlarında da fenolik madde içerikleri düşük olmalarına karşın önemli oranda antioksidan aktivite gözlemlendi. Bu da, antioksidan aktiviteden farklı bileşik gruplarının sorumlu olabileceklerini göstermektedir.

-Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki ekstraktın hangi materyalden, hangi yöntemle, hangi şartlarda elde edildiğine göre değişmektedir. Bazı ekstraktlar toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasında pozitif doğrusal bir ilişki ortaya koymakta iken (örneğin parça büyüklüğü ve çözücü etkisi deneylerinde elde edilen ekstraktlarda), bazılarında ise

bu ilişki ya ters orantı biçiminde (ekstraksiyon süresinin etkisi deneylerinde elde edilen ekstraktlarda) elde edildi ya da böyle bir ilişki hiç kurulamadı (ana çalışma kısmındaki yaprak ve kabuk ekstraktlarında). Sonuç olarak toplam fenolik madde içeriğinin antioksidan aktivite belirlemede önemli bir parametre olduğu, ancak tek başına bu özellikten sorumlu olmadığı; bu ilişkinin paragrafın başında ifade edilen etkenlerin haricinde, bileşiklerin her birinin farklı antioksidan etkilere sahip olabilmeleri, çözelti ortamında mevcut farklı bileşik gruplarının antioksidan etkilerini artırıcı veya azaltıcı bir takım etkileşmelere girebilmeleri gibi etkenlere bağlı olabileceği söylenebilir.

-Ekstraksiyonlarda, 125-250 µm parçacık büyüklüğü, maksimum 30 dk'lık süre ve çözücü olarak da metanol kullanılmasının, en iyi toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitelerine ulaşmak için optimum şartlar olarak bulundu. Ancak ekstraksiyon ortamında inert bir madde kullanılması durumunda (örneğin kum, cam parçaları vs) 0-125 µm parçacık büyüklüğüne sahip numunelerden daha iyi sonuçlar alınabilir. Antioksidan aktiviteler açısından en iyi sonuçlar, 15 dakikalık ekstraksiyonlardan elde edilmiş olmasına rağmen, 30 dakikalık ekstraksiyonlarda elde edilen değerlerle birbirine çok yakın olduklarından ve ancak bu sürenin aşılması durumunda değerlerde anlamlı bir farklılık ortaya çıktığından (Çizelge 17 ve Şekil 24), 30 dakikalık ekstraksiyon süresi, optimum ekstraksiyon süresi olarak alınmıştır.

-Kullanılan teknikler açısından bir karşılaştırma yapılacak olursa, Soxhlet ve süperkritik ekstraksiyon metodlarının etkililikleri, ekstraksiyonun hangi bitkiden ve bitkinin hangi kısmından yapıldığına göre değişmektedir. Örneğin, toplam fenolik madde içeriği açısından bakıldığında, yaprak numunelerinde süperkritik ekstraksiyon daha iyi sonuçlar vermekte iken, kabuk numunelerinde Soxhlet ekstraksiyonları daha iyi sonuçlar vermiştir. Ayrıca gövde ekstraktlarında *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisi için Soxhlet tekniği daha iyi sonuçlar vermiştir. Antioksidan aktiviteler açısından ise, DPPH radikal temizleme aktivitesi testlerinde *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisi için yaprak numunelerinde iki teknik arasında önemli bir fark gözlenmezken, kabuk ekstraktlarında Soxhlet tekniği, gövde ekstraktlarında ise

süperkritik akışkan tekniği daha iyi sonuçlar vermiştir (Çizelge 8 ve Şekil 13). Fe-III iyonu indirgeme antioksidan gücü testlerinde ise, DPPH yönteminde olduğu gibi gövde ekstraktları açısından süperkritik akışkan tekniği, yaprak ve kabuk ekstraktlarında ise *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisi için Soxhlet tekniği daha iyi sonuçlar vermiştir (Şekil 13). Ancak, süperkritik metanol ekstraksiyonlarının, metanolik Soxhlet ekstraksiyonlarına göre uygulanmasının daha kolay, daha az zaman alıcı (örneğin, aynı değerlerin elde edildiği Soxhlet ekstraktları yaklaşık 6 saat gibi bir ekstraksiyon süresi gerektiriyorken, süperkritik akışkan ekstraksiyonlarında bu süre en fazla 30 dakika gerektirmektedir), daha az malzeme tüketici (örneğin, bir Soxhlet ekstraksiyonu için 150-200 ml metanol kullanılıyorken, bir süperkritik ekstraksiyon için 15-20 ml metanol kullanılmıştır) ve ayrıca bu çalışma kapsamında uygulanmamasına rağmen, çözücüye farklı polaritede bir çözücü ilave etmek suretiyle elde edilen ekstrakt verimleri ile bileşik çeşitliliğinde artış sağlayabilme yeteneğine sahip olması nedeniyle daha avantajlı olduğu ifade edilebilir.

Sonuç olarak, *Laurocerasus officinalis* Roem. bitkisinin yaprak, kabuk ve gövde kısımlarından Soxhlet ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemleri ile elde edilen ekstraktların yüksek düzeyde fenolik madde içeriğine ve antioksidan aktiviteye sahip oldukları ortaya konmuştur. Genel bir bakış açısıyla çalışma, bitkinin kabuk ve gövde kısımlarının da önemli oranda fenolik bileşik ve antioksidan aktivite içerebileceğini göstermiştir.

Tartışma kısmında da belirtildiği üzere, elde edilen RP-LC-UV kromatogramları zengin bir içerik ortaya koymakta, ancak çalışma kapsamında araştırılan fenolik asit standartları ile nispeten az sayıda pik örtüşmektedir. Bu durum ekstraktlarda fenolik asitler haricinde flavonoid türü veya türevi bileşiklerin olabileceğini göstermektedir. Çalışma kapsamında uygulanmayan asit hidrolizi ile ve ilave flavonoid standartlarıyla glikozidik flavonoidlerin piklerinin davranışları incelenebilir ve böylece ekstraktlarda mevcut olabilecek flavonoidler takip eden bir çalışma kapsamında aydınlatılabilir. Ayrıca katı faz ekstraksiyonu ile gözlenme sınırının

altında kalan fenolik bileşikler daha yüksek konsantrasyonlarda incelenerek aydınlatılabilir.

Literatürde, bitkisel materyallerin özellikle meyve ve yapraklarının antioksidan aktiviteleri ve fenolik madde içeriklerinin tespitine dair sayısız çalışma mevcut olmakla birlikte, kabuk, gövde, kök gibi diğer bitkisel dokular için yapılmış benzer çalışma sayısı oldukça azdır. Oysa, yapılan daha önceki çalışmalar ve bu çalışmada da ortaya konduğu gibi, bitkilerin bu kısımları da önemli bir antioksidan aktif madde kaynağı olabilirler. Bu nedenle, değişik teknikler kullanılarak bitkilerin bu kısımları üzerinde gerçekleştirilecek benzer çalışmalara biraz daha ağırlık verilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1]. Bilaloğlu, G.V., Harmandar, M. (1999) Flavonoidler, Bakanlar Matbaacılık Ltd.Şti. p.336-343, İstanbul.
- [2]. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan> (Erişim Tarihi ARALIK 2007)
- [3]. Matill HA (1947). "Antioxidants". Annu Rev Biochem 16: 177-192.
- [4]. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). 'Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma'. Türk Nef. Diyaliz ve Transpl. Der. 3-4;92-95
- [5]. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırimer
- [6]. Akkuş İ (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.
- [7]. Halliwell B, Gutteridge JMC (2001) Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24.
- [8]. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992) Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 119(6), 598-620.
- [9]. Babior BM (2000) Phagocytes and oxidative stress. The American Journal of Medicine 109(1):33-44.
- [10]. Kuyvenhoven JP, Meinders AE (1999) Oxidative stress and diabetes mellitus, Pathogenesis of long-term complications. European Journal of Internal Medicine 10(1), 9-19.
- [11]. Graham Solomons T.W. (2000) Organic Chemistry, Sixth Edition, John Wiley&Sons Inc, 398-400
- [12]. Wolf G (2005). "The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill". J Nutr 135 (3): 363
- [13]. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. Lancet 1994; 344:721-4.
- [14]. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur J Cancer 1996;32A:30-8

- [15]. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
- [16]. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000;49:27-9.
- [17]. Davies KJ. Protein oxidation and proteolytic degradation. General aspects and relationship to cataract formation. *Adv Exp Med Biol* 1990;264:503-11.
- [18]. Pinelo M, Rubilar M, Sinerio J, Nùñez M.J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*. 2004;85:267-273.
- [19]. Buettner GR, *Radiation Research* 1996;145:532-541.
- [20]. Abdille Md.H, Singh R.P, Jayaprakasha G.K, Jena B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chemistry*. 2005;90:891-896.
- [21]. Tepe B, Sokmen M, Akpulat H.A, Sökmen A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*. 2006;95:200-204.
- [22]. Maslarova, N.V.Y. 2001. Inhibiting Oxidation. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press, USA.
- [23]. Meyer, A.S., Suhr, K.I., and Nielsen, P. 2000. Natural Food Preservatives. In T. Ohlsson and N. Bengtsson(eds), *Minimal processing technologies in the food industry*. CRC Press, USA.
- [24]. Heinonen, I.M. 2002. Antioxidants in Fruits, Berries and Vegetables. In W. Jongen (ed), *fruit and vegetable processing – improving quality*. CRC Press, USA.
- [25]. Shi, H., Noguchi, N., and Niki, E. 2001. Introducing Natural Antioxidants. In J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press, USA.
- [26]. Beecher G.R, Overview of dietary Flavonoids. *J. Nutr.* 133:3248S-3254S
- [27]. Disilvestro, R.A. 2001. Flavonoids as Antioxidants. In R.E.C. Wildman, *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Press, USA.



- [28]. Awad, M.A., de Jager, A. 2003. Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples and other fruits. *Postharvest Bio. and Tech.*, (27),53-58.
- [29]. Cordenunsi, B.R., Genovese, M.I., Nascimento, J.R.O., Hassimotto, N.M.A., Santos, R.J., and Lajolo, F.M.2004. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, article in press.
- [30]. Faulks, R.M., Sauthon, S. 2001. Carotenoids, Metabolism and Disease. In R.E.C. Wildman (ed), *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Press, USA.
- [31]. Meyer, A.S., Suhr, K.I., and Nielsen, P. 2000. Natural Food Preservatives. In T. Ohlsson and N. Bengtsson (eds), *Minimal processing technologies in the food industry*. CRC Press, USA.
- [32]. Langseth, L. 2000. Antioxidants and Their Effect on Health. In M.K. Schmidl and T.P. Labuza (eds), *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publication, USA.
- [33]. Caillet S, Salmiéri S, Lacroix M. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry*. 2006;95:1-8.
- [34]. Gray, J.I.: *JAOCS* 55, 539 (1978).
- [35]. Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C.: *Food Chem.* 72, 145 (2001).
- [36]. Shahidi, F , Wanasundara, K.J.: *Critical Reviews in Food Sci, Nutrition* 32(1), 67 (1992).
- [37]. Proestos C, Boziaris I.S, Nychas G.-J.E, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 2006;95:664-671.
- [38]. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J., *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1990
- [39]. Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Miniati E., *J. Agric Food Chem.* 40 (1992) 1571

- [40]. Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Miniati E., J. Agric. Food Chem. 40 (1992) 1577
- [41]. Gao L., Mazza G., J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 343.
- [42]. Escarpa, A., Gonza'lez, M.C., J. Chromatogr. A 897 (2000) 161
- [43]. H.M. Merken, G.R. Beecher, J. Chromatogr. A 897 (2000) 177.
- [44]. A. Escarpa, M.C. Gonza'lez, J. Chromatogr. A 830 (1999) 301.
- [45]. P.S. Rodis, V.T. Karathanos, A. Mantzavinou, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 596.
- [46]. R. Sladkovsky, P. Solich, L. Opletal, J. Pharm. Biomed Anal. 24 (2001) 1049.
- [47]. L.Z. Lin, X.G. He, M. Lindenmaier, G. Nolan, J. Yang, M. Cleary, S.X. Qiu, G.A. Cordell, J. Chromatogr. A 876 (2000) 87.
- [48]. L. Hua, Z.F. Peng, L.S. Chia, N.K. Goh, S.N. Tan, J. Chromatogr. A 909 (2001) 297
- [49]. R. Capasso, A. Evidente, C. Vasca, L. Gianfreda, M. Maremonti, G. Greco, Appl. Biochem. Biotechnol. 61 (1996), 365.
- [50]. Tura, D., Robards, K., Sample Handling Strategies for the Determination of Biophenols in Food and Plants, *Journal of Chromatography A*, 975, 71–93, (2002).
- [51]. D.M. Peterson, C.L. Emmons, A.H. Hibbs, J. Cereal Sci. 33 (2001) 97. (2001) 97.
- [52]. L.H. Dimberg, E.L. Molteberg, R. Solheim, W. Frolich, J. Cereal Sci. 24 (1996) 263
- [53]. J.S. Bonvehi, M.S. Torrento, E.C. Lorente, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 1848.
- [54]. D.M. Peterson, C.L. Emmons, A.H. Hibbs, J. Cereal Sci. 33 (2001) 97.
- [55]. M. Tasioula-Margari, O. Okogeri, Food Chem. 74 (2001) 377.
- [56]. W. Andlauer, M.J. Martena, P. Furst, J. Chromatogr. A 849 (1999) 341.
- [57]. A. von Gadow, E. Joubert, C. F. Hansmam, Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea Food Chemistry, 60 (1), 73-77, (1997).
- [58]. 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).
- [59]. 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).
- [60]. MAJORS, R.E., Supercritical Fluid Extraction: An Introduction, *LC-GC Magazine of Separation Science*, 9 (2), 78, (1991).
- [61]. HAWTHORNE, S.B., Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction, *Analytical Chemistry*, 62 (11), 633A-42A, (1990).
- [62]. IBÁÑEZ, E., López-Sebastián, S., Ramos, E., Tabera, J, Reglero, G., Analysis of Highly Volatile Components of Foods by Off-line SFE/GC, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (10), 3940-43, (1997).
- [63]. HENNING, J.A., Core, R.J., Gardea-Torresdey, J.L., Extracting Volatile Compounds from Single Plants Using Supercritical Fluid Extraction, *Crop Science*, 34, 1120-22, (1994).
- [64]. OTTERBACH, A., Wenclawiak, B. W., Ultrasonic/soxhlet/supercritical Fluid Extraction Kinetics of Pyrethrins from Flowers and Allethrin from Paper Strips, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 365, 472-4, (1999).
- [65]. TEHRANI, J., Successful Supercritical Fluid Extraction Strategies, *American Laboratory*, 25 (2), 40HH-40MM, (1993).
- [66]. HAWTHORNE, S. B., Rickkola, M. L. Srenius, K., Holm, Y., Hiltunen R., Hartonen K., Comparison of Hydrodistillation and Supercritical Fluid Ekstraktion for the Determination of Essential Oils in Aromatic Plants, *Journal of Chromatography A*, 634, 297-308, (1993)
- [67]. A.P. Jarvis, D. Morgan, *Phytochem. Anal.* 8 (1997) 217
- [68]. M.T. Tena, A. Rios, M.Valcárcel, *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 143.
- [69]. F. Le Floch, M.T. Tena, A. Rios, M. Valca´rcel, *Talanta* 46 (1998) 1123.
- [70]. Mauricio A. Rostagno, Júlio M.A. Araújo, Delcio Sandi, Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour, *Food Chemistry* 78 (2002) 111–117

- [71]. Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2001). Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolyzates of lignocellulosic materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2459–2464
- [72]. J. González, J.M. Cruz, , H Domínguez, J.C. Parajó, Production of antioxidants from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates, *Food Chemistry* 84 (2004) 243–251
- [73]. Heng Gao, Todd F. Shupe, Chung Y. Hse Thomas L. Eberhardt, Antioxidant activity of extracts from the bark of *Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray) Parl., *Holzforschung*, Vol. 60, pp. 459–462, 2006.
- [74]. Heng Gao Todd F. Shupe Thomas L. Eberhardt Chung Y. Hse, Antioxidant activity of extracts from the wood and bark of Port Orford cedar, *Journal of Wood Science* (2007) 53:147-152
- [75]. Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., Parajó, J. C., Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 67, 147–153. (1999).
- [76]. Barclay, L. R. C., Xi, F., Norris, J. Q. (1997). Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 17(1 & 2), 73–90
- [77]. Habiyaemye, A. Stevanovic-Janezic, T., Riedl, B., Garneau, F.-X., Jean, F.-I. (2002) Pentacyclic triterpene constituents of yellow birch bark from Quebec, *Journal of Wood Chemistry and Technology* , 22:83–91.
- [78]. Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 4. Edinburgh: University Press; 1972. p. 8.
- [79]. Ayaz, F. A.; Reunanen, M.; Küçükislamoglu, M.; Var, M. Seed fatty acid composition in wild form and cultivars of *Lauorocerasus officinalis* Roem. *Pakistan J. Bot.*, 276 (2), 305-308. 1995
- [80]. Grieve M. *A modern herbal*, vol. II. New York: Dover Publications; 1971. p. 453–73.
- [81]. S. Kolaylı, M. Küçük,, C. Duran, F. Candan, B. Dinçer, *Chemical*

- and Antioxidant Properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) Fruit Grown in the Black Sea Region, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7489-7494
- [82]. Baytop, T. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*, 1st ed.; Istanbul University: Istanbul, Turkey, 2001; pp 178-249.
- [83]. Milan, S. P. A. *The Macdonald Encyclopedia of Medicinal Plants*; Macdonald: London, U.K., 1984; p 252.
- [84]. Ayaz, F. A. Studies on water soluble sugar and sugar alcohol in cultivar and wild forms of *Laurocerasus officinalis* Roem. *Pakistan J. Bot.* 1997, 29 (2), 331-336.
- [85]. Akdeniz, F., Gündoğdu, M., Direct and alkali medium liquefaction of *Laurocerasus officinalis* Roem, *Energy Conversion and Management*, 48 189–192, (2007)
- [86]. 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).
- [87]. Tura, D., Robards, K., Sample Handling Strategies for the Determination of Biophenols in Food and Plants, *Journal of Chromatography A*, 975, 71–93, (2002).
- [88]. Slinkard, K., Singleton, V. L., Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55, (1977).
- [89]. 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).
- [90]. 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).

- [91]. Wu, Q., Wang, M., Simon, J.E., Analytical Methods to Determine Phytoestrogenic Compounds, *Journal of Chromatography B*, 812, 325-55, (2004).
- [92]. Siriwardhana, S. S. K. W., Shahidi, F., Antiradical Activity of Extracts of Almond and Its By-Products, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 903–8, (2002).
- [93]. Chen, Y., Wang, M., Rosen, R. T., Ho, C.-T., 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical-Scavenging Active Components from *Polygonum multiflorum* Thunb., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2226–28, (1999).
- [94]. Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., Peskin, A.V., Antioxidant Activity of Procyanidin-Containing Plant Extracts at Different pHs, *Food Chemistry*, 77, 155-61, (2002).
- [95]. Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Núñez, M.J., Extraction of Antioxidant Phenolics from Almond Hulls (*Prunus amygladus*) and Pine Sawdust (*Pinus pinaster*), *Food Chemistry*, 85, 267-73, (2004).
- [96]. 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).
- [97]. Yaylacı, F., Kolaylı, S., Küçük, M., Alpay-Karaoğlu Ş., Ulusoy, E., Biological Activities of Trunk Bark Extracts of Five Tree Species from Anatolia, Turkey, *Asian Journal of Chemistry*, 19 (3), 2241-56, (2007).
- [98]. Marinova, E. M., Yanishlieva, N. V., Effect of Lipid Unsaturation on the Antioxidative Activity of Some Phenolic Acids, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 71 (4), 427–34, (1994).
- [99]. Cuvelier, M. E., Richard, H., Berst, C., Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-Phenols: Structure–Activity Relationship, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 324–5, (1992).
- [100]. Chun, M. K., Shin, H. W., Lee, H., Supercritical Fluid Extraction of Paclitaxel and Baccatin III from Needles of *Taxus cuspidata*, *The Journal of Supercritical Fluids*, 9 (3) 192-198, (1996).

- [101]. Küçük, M. M., Ağırtaş, S., Liquefaction of *Prangmites australis* by Supercritical Gas Extraction, *Bioresource Technology*, 69, 141–3, (1999).
- [102]. 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) .
- [103]. 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).
- [104]. Muchuweti, M., Nyamukonda, L., Chagonda, L. S., Ndhala, 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).
- [105]. 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).
- [106]. 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)
- [107]. 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).

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gaye YUCAYURT

Doğum Yeri : Kars

Doğum Tarihi : 09.04.1979

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yılı)

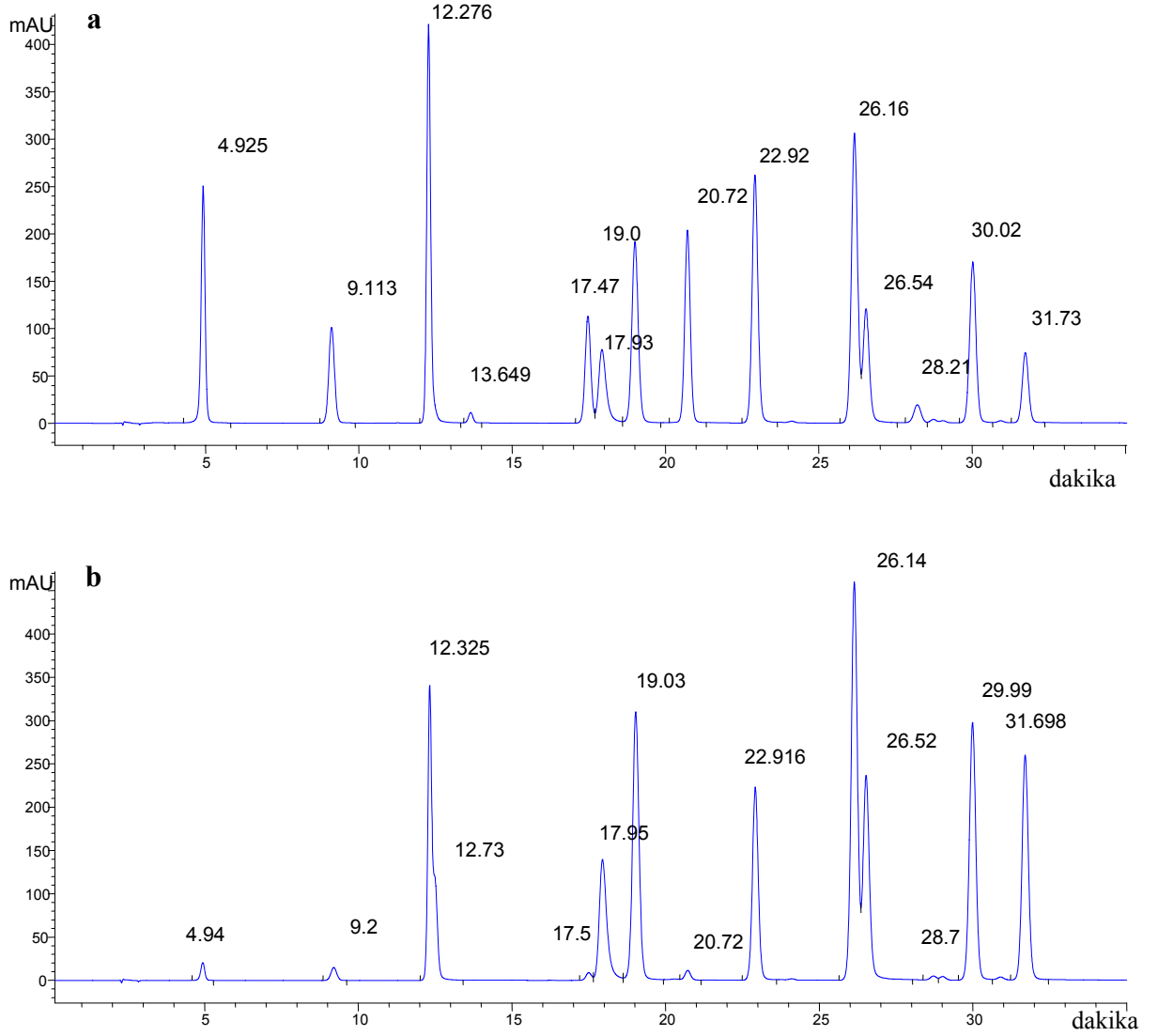
Lise : Kars Anadolu Lisesi-1995

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü-2005

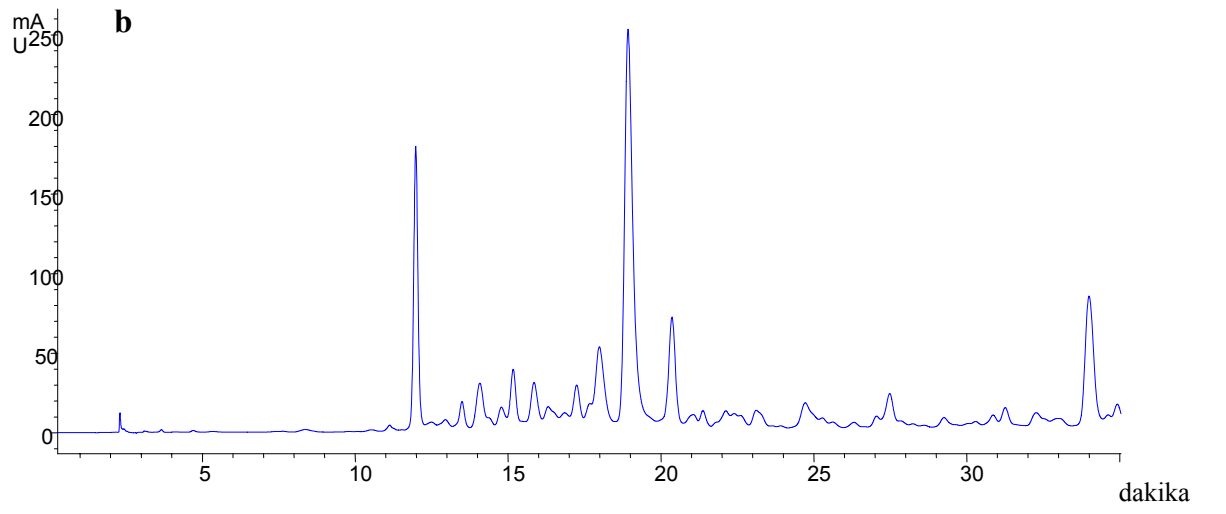
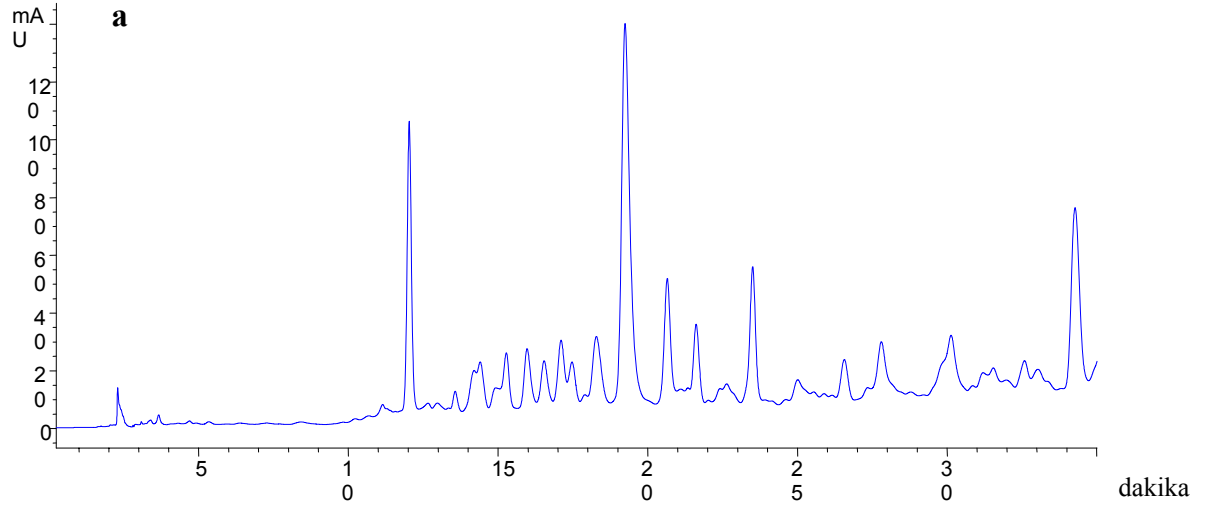


## 8. EKLER

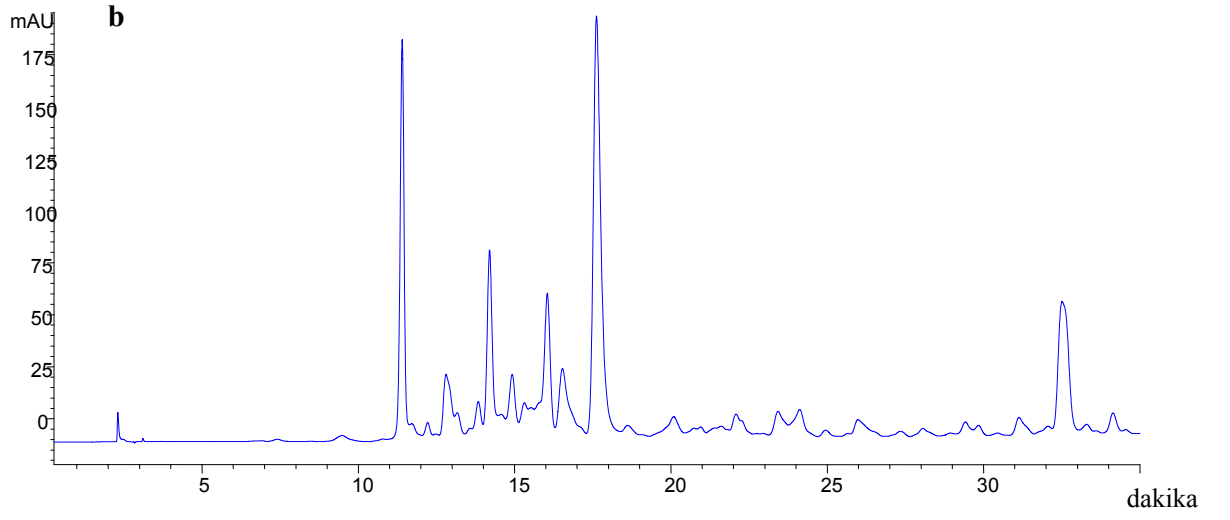
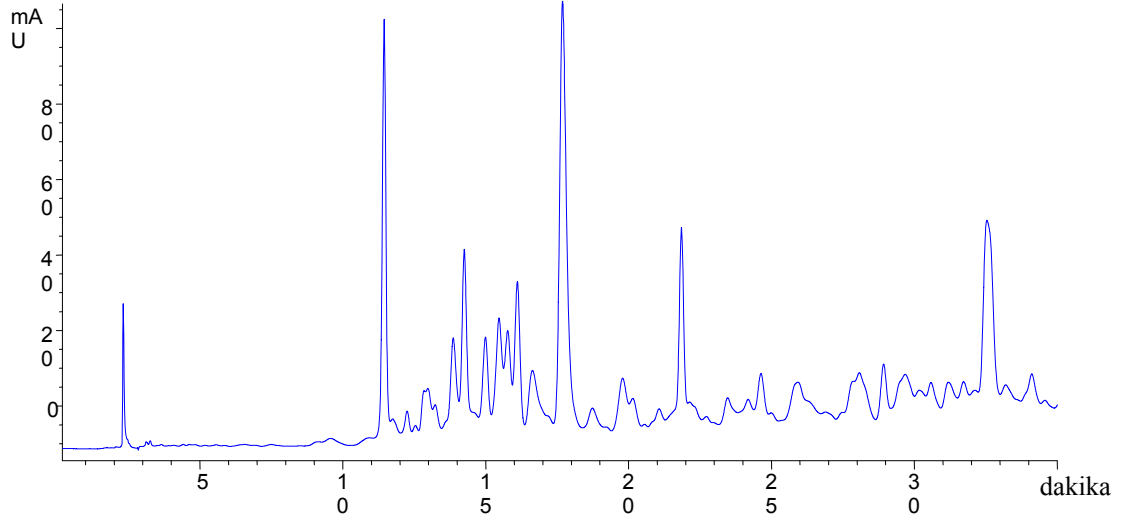
### 8.1. Seçimli Ekstraksiyon Öncesi Ekstraktlardan Elde Edilen RP-LC-UV Kromatogramları



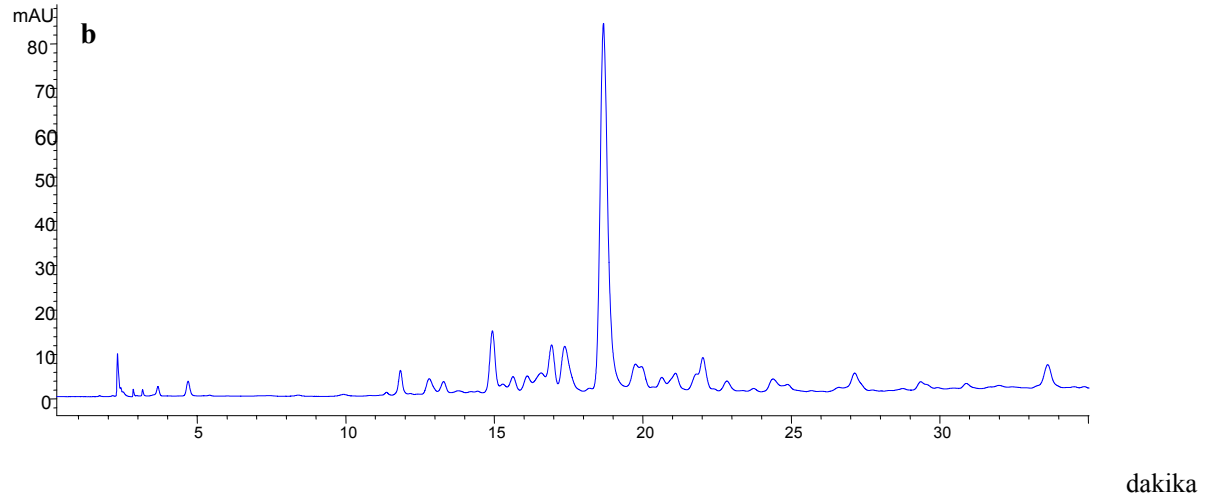
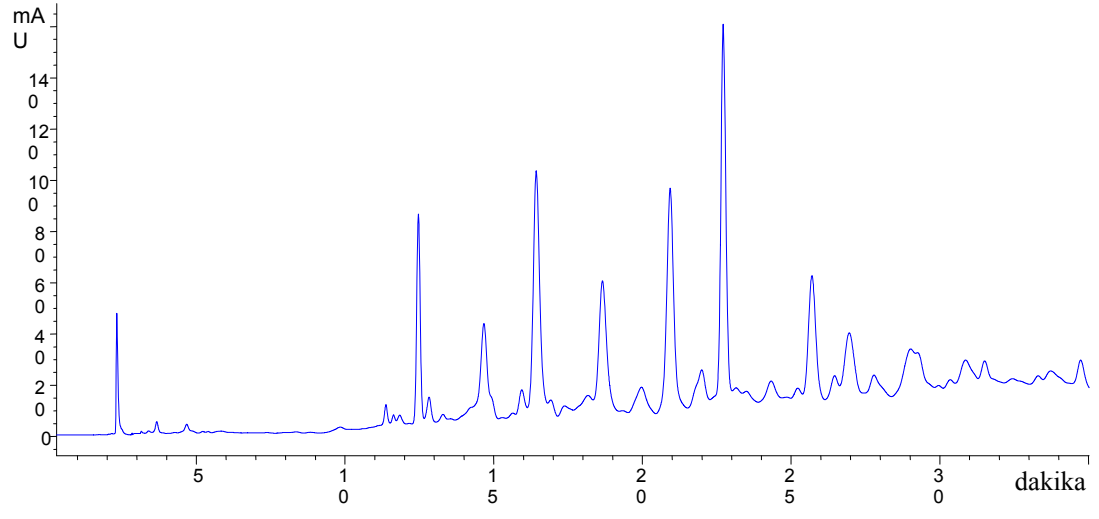
Ek Şekil 1. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Her bir standardın konsantrasyonu 50 ppm'dir.



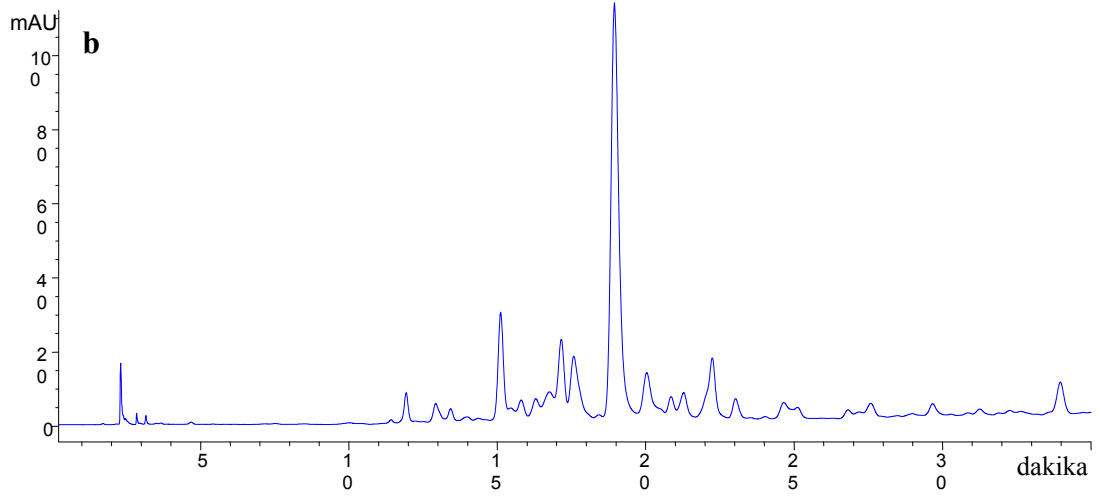
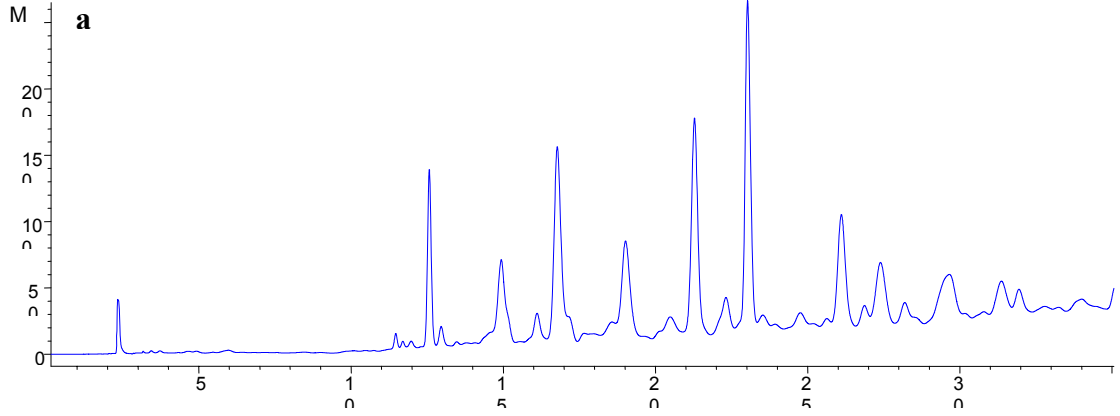
Ek Şekil 2. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LYSC'ye ait kromatogramlar.



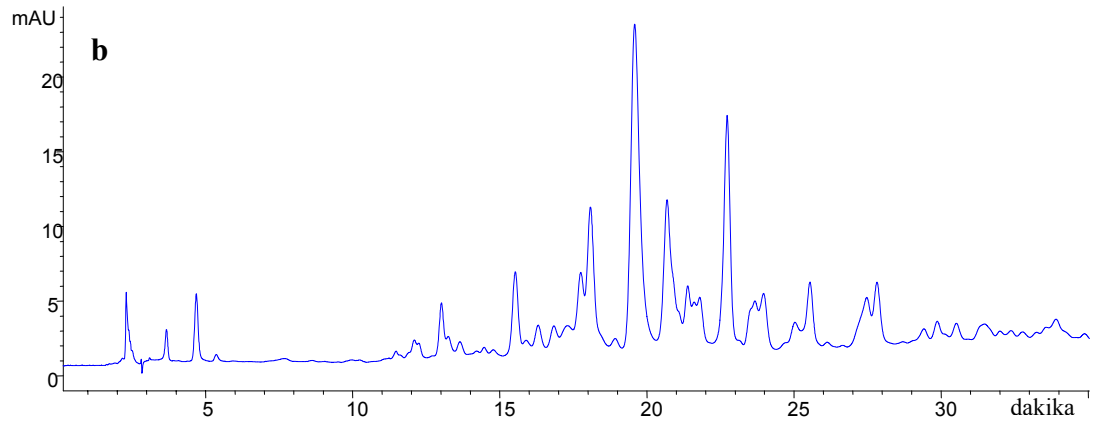
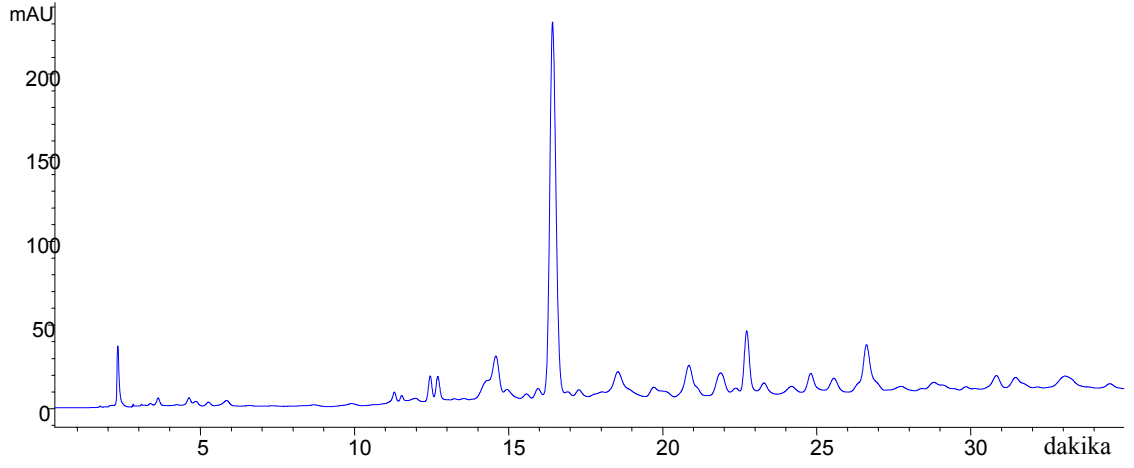
Ek Şekil 3. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LYSX'e ait kromatogramlar.



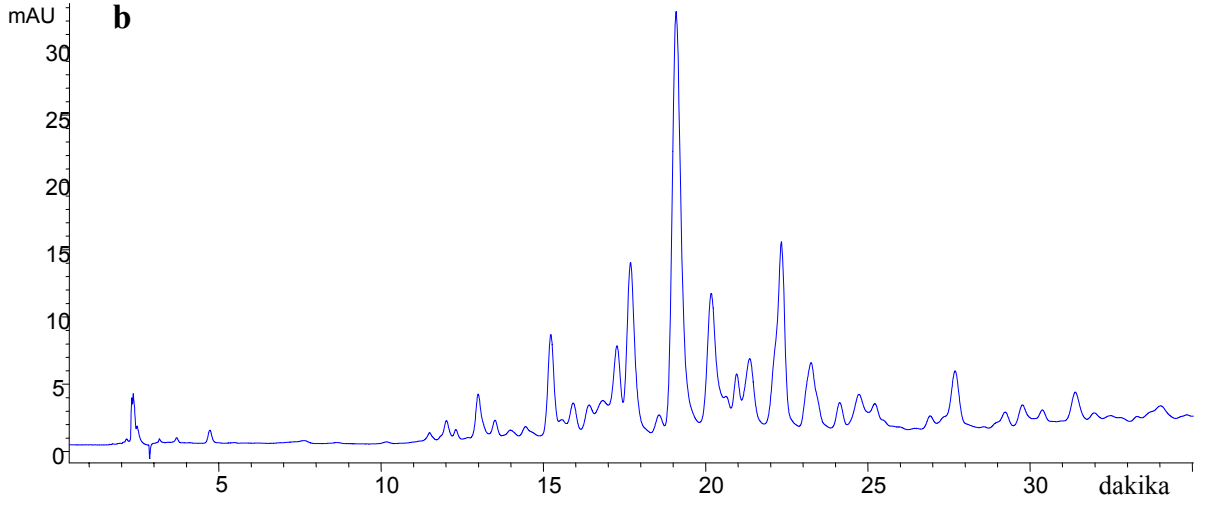
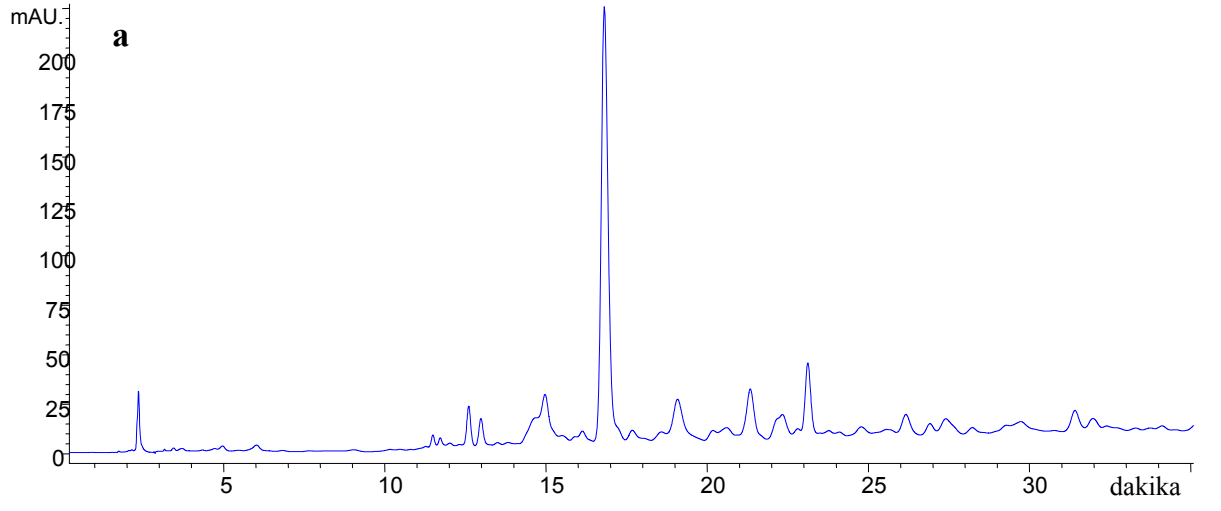
Ek Şekil 4. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LKSC' ye ait kromatogramlar.



Ek Şekil 5. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LKSX'e ait kromatogramlar.

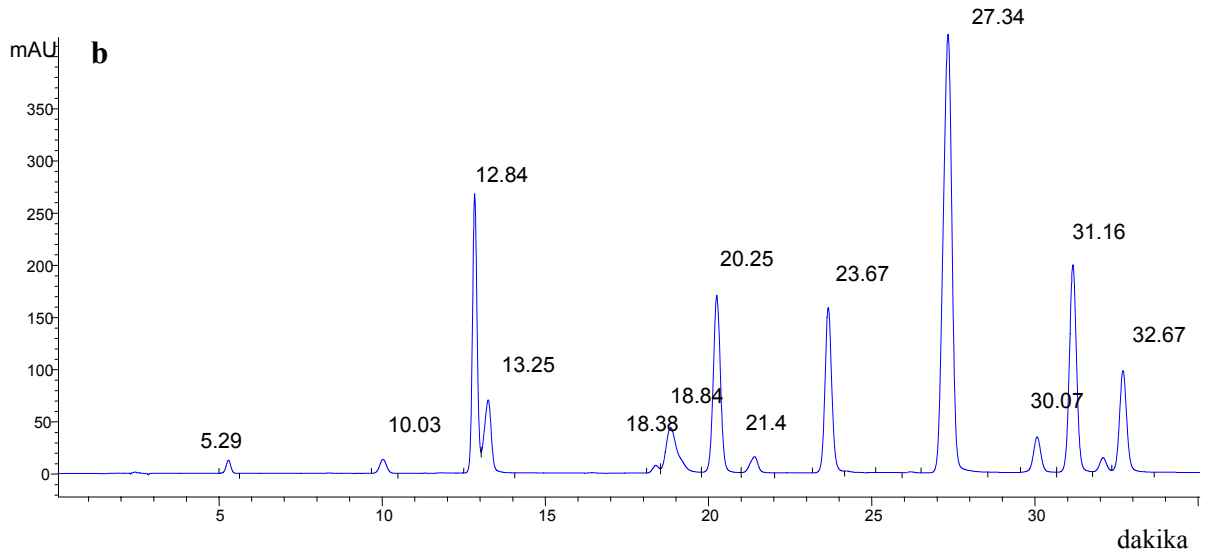
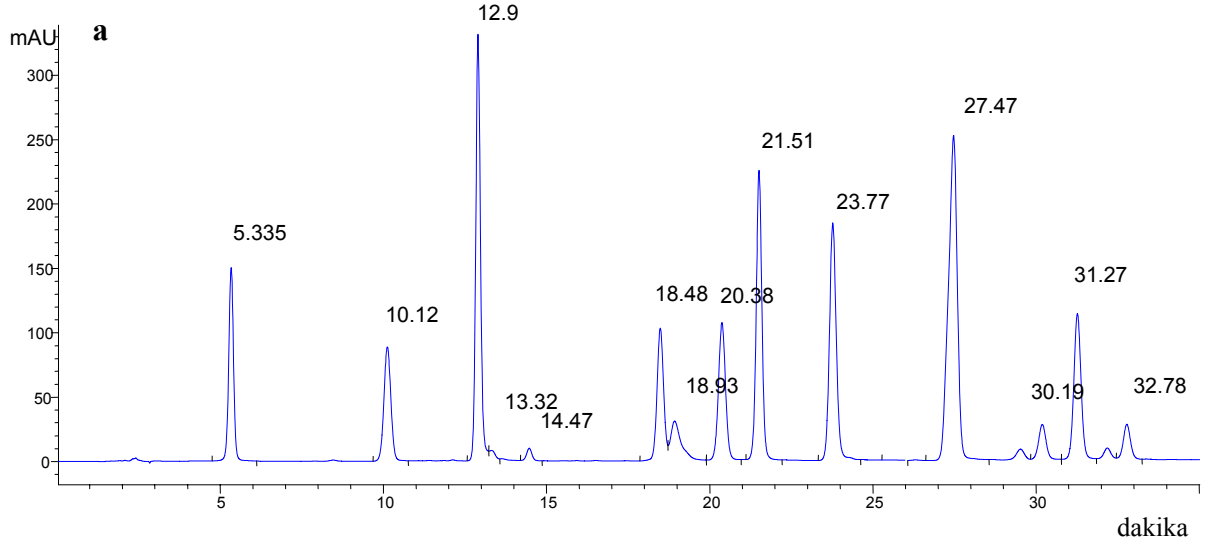


Ek Şekil 6. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LGSC'ye ait kromatogramlar.



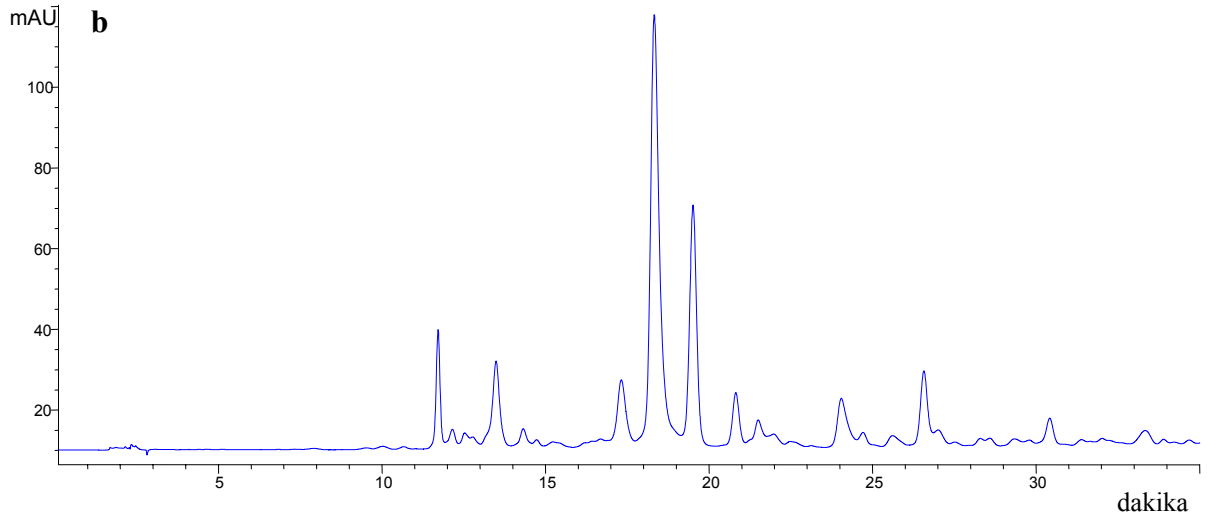
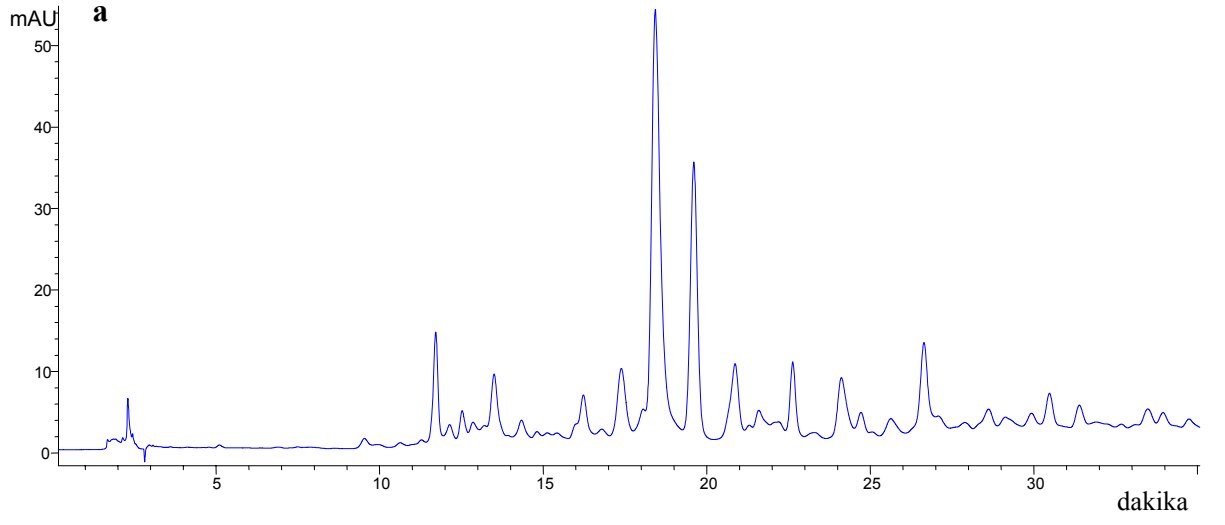
Ek Şekil 7. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de LGSX'e ait kromatogramlar.

## 8.2. Seçimli Ekstraksiyon Sonrası Ekstraktlardan Elde Edilen RP-LC-UV Kromatogramları

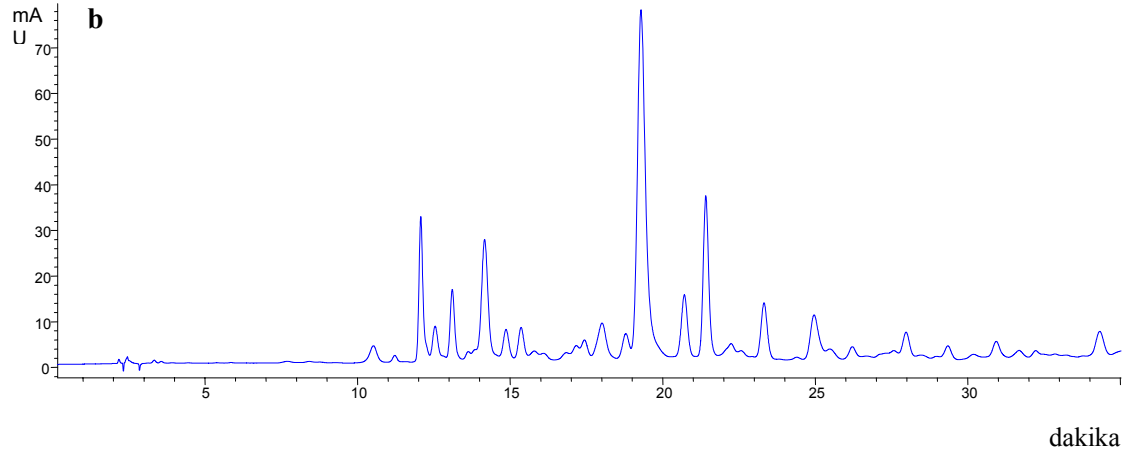
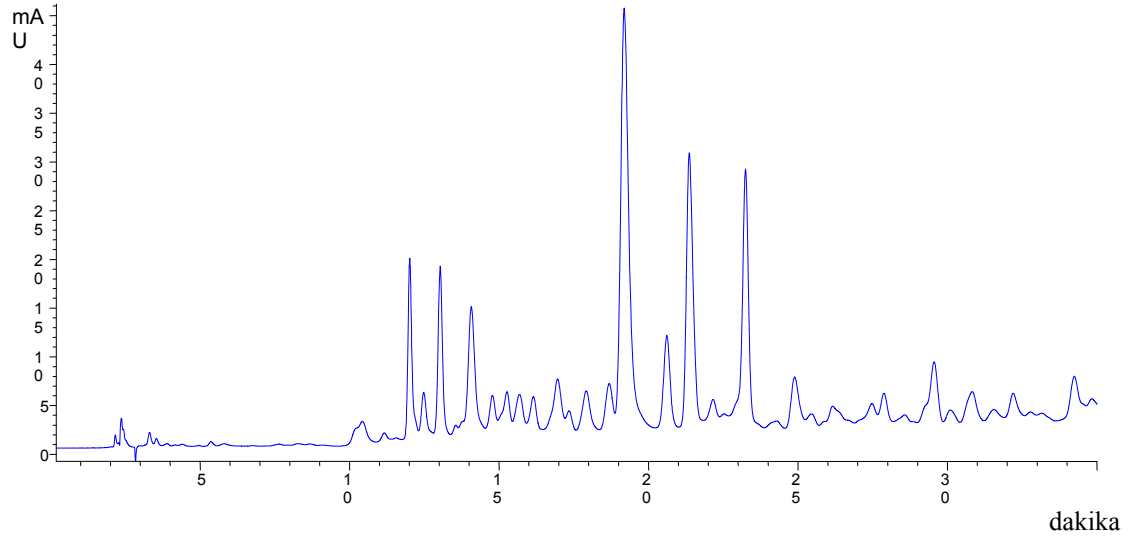


Ek Şekil 8. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyondan sonra elde edilen fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Her bir standardın ekstraksiyona başlangıç konsantrasyonu 50 ppm'dir.

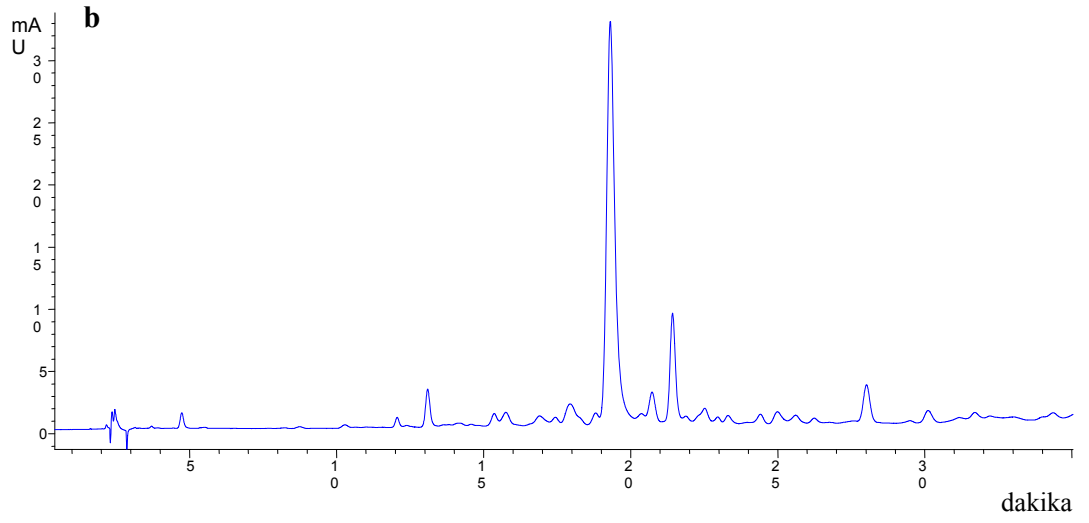
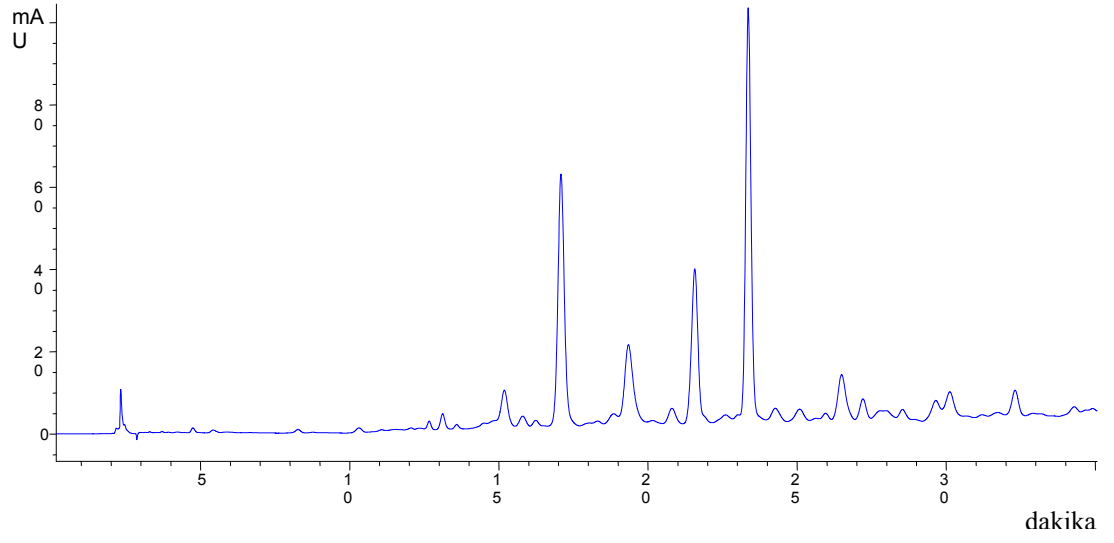




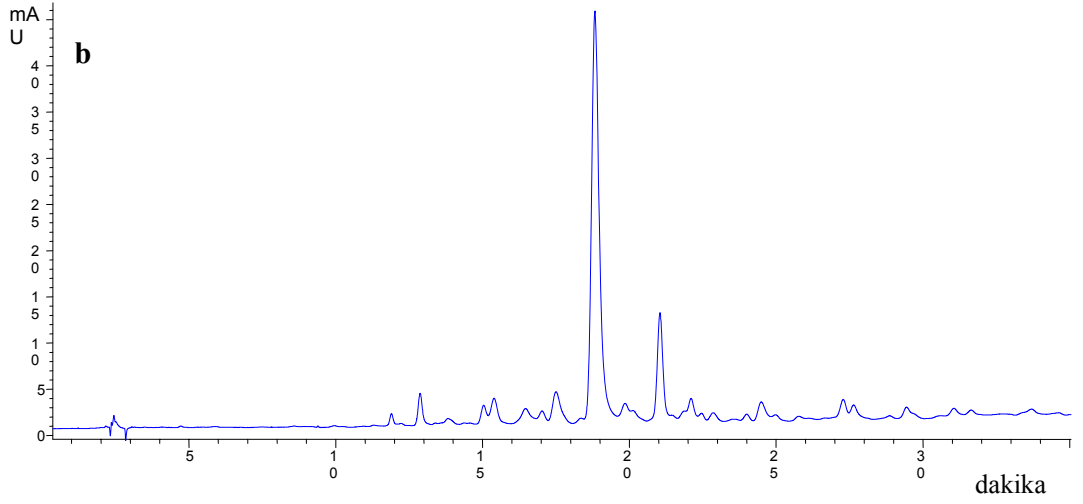
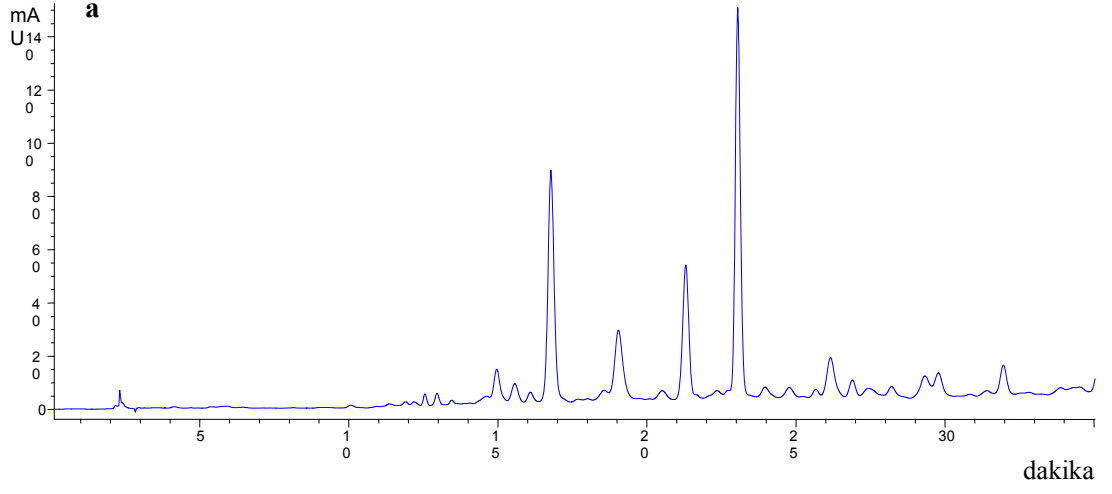
Ek Şekil 9. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LYSC'ye ait kromatogramlar.



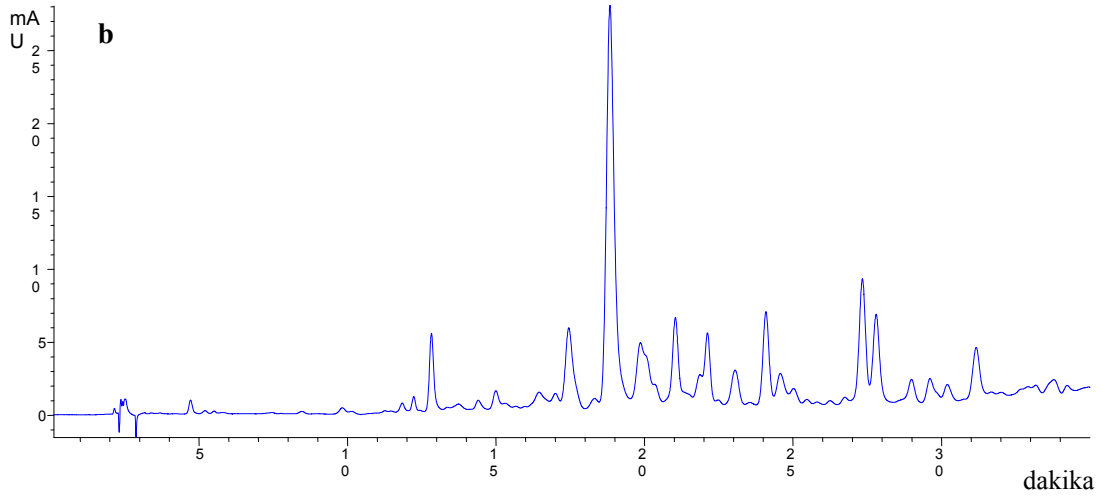
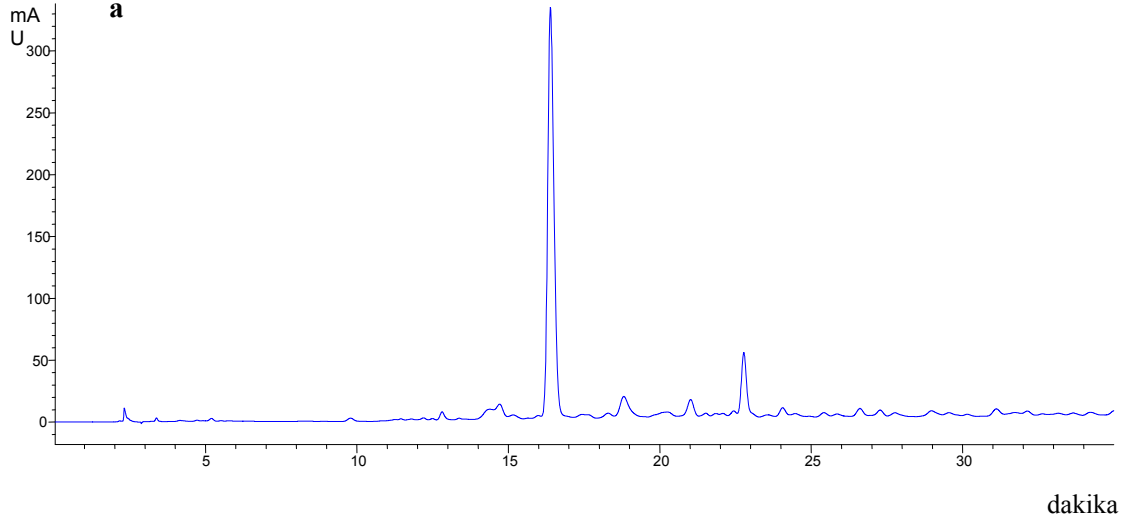
Ek Şekil 10. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LYSX'e ait kromatogramlar.



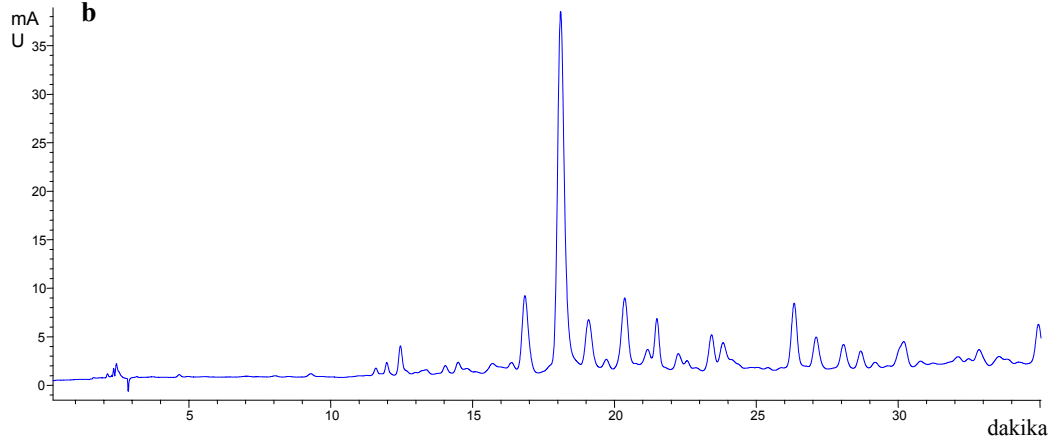
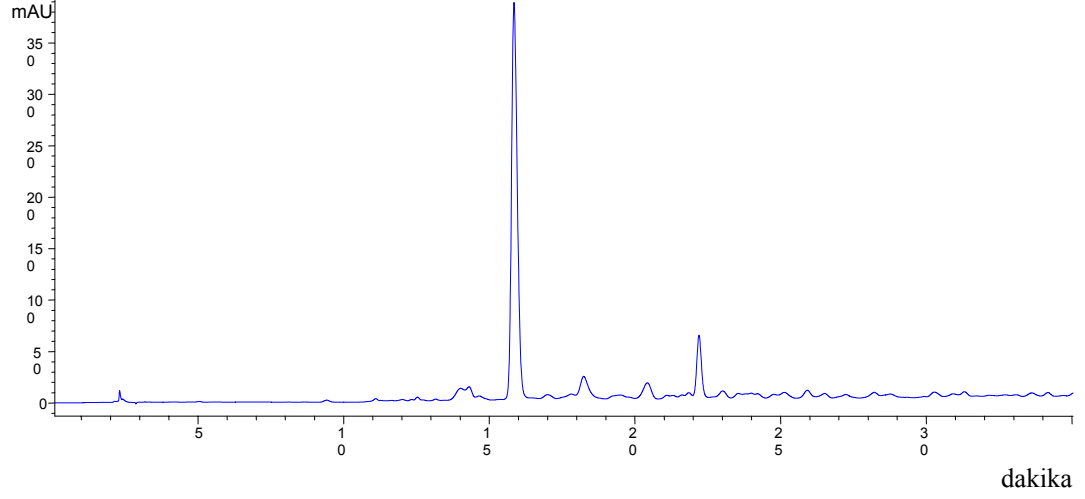
Ek Şekil 11. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de ekstraksiyon sonrasında LKSC'ye ait kromatogramlar.



Ek Şekil 12. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LKSX'e ait kromatogramlar



Ek Şekil 13. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LGSC'ye ait kromatogramlar.



Ek Şekil 14. LC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm (b)'de seçimli ekstraksiyon sonrasında LGSX'ye ait kromatogramlar.