



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ACHILLEA GRANDIFOLIA* FRIV. BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ
FLAVONOİDLERİN SAPTANMASI VE ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

DUYGU TAŞKIN

DOKTORA TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Dilek BİLGİÇ ALKAYA

2015-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ACHILLEA GRANDIFOLIA* FRIV. BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ
FLAVONOİDLERİN SAPTANMASI VE ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

DUYGU TAŞKIN

DOKTORA TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Dilek BİLGİÇ ALKAYA

2015-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Analitik Kimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Duygu TAŞKIN
Tez Başlığı : *Achillea grandifolia* Friv. Bitkisinin İçerdiği Flavonoidlerin
Saptanması ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi
Sınav Yeri : Analitik Kimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 17.06.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Yard. Doç. Dr. Dilek Bilgiç Alkaya

Kurumu

Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Emre Dölen

İstanbul Üniversitesi



Prof.Dr. Güler Yalçın

Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Prof.Dr. Türkan Yurdun

Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

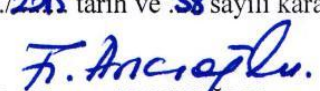


Doç.Dr. Ece Kök Yetimoğlu

Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06.07.2015 tarih ve 38 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Duygu Taşkın



Sevgili eşim Turgut Taşkın'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

*Akademik hayatıma başladığım günden itibaren benden desteğini, ilgisini, emeğini esirgemeyen, bilgisinden ve tecrübesinden her zaman istifade ettiğim, bugüne dek bana gösterdiği her türlü destek için hayatımda çok büyük öneme sahip olan ve olacak olan ilk danışmanım değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Emre DÖLEN'e**,*

*Çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın **Yrd. Doç. Dr. Dilek Bilgiç ALKAYA'ya**,*

*Tez çalışmamda Yeni Yüzyıl Üniversitesi'nin tüm imkanlarını kullanmamı sağlayan ve imkan yaratan Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı değerli hocam Sayın **Prof. Dr. İmer OKAR'a**,*

*Tezimin ilerlemesine katkı sağlayan, bilimsel bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD Başkanı değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Sıdıka SUNGUR'a**,*

*Bilimsel bilgi ve tecrübeleriyle tezime ışık tutan değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Güler YALÇIN'a**,*

*Tezime göstermiş olduğu değerli katkılarından dolayı Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD öğretim üyesi değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Türkan YURDUN'a**,*

*Bu zaman zarfında benden desteklerini esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD'ndeki tüm değerli hocalarıma, tez bitkimin teşhisini yapan Sayın **Prof. Dr. Ertan TUZLACI'ya**, teşekkürlerimi bir borç bilirim.*

Eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek ve güç veren canım annem, babam ve ağabeyime,

*Tez çalışmam süresince desteğini her zaman hissettiğim, varlığıyla bana güç veren canım eşim **Turgut TAŞKIN'a** tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.*

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP 120613-0246 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Botanik Bilgiler	6
2.1.1 Asteraceae (Compositae) familyası	6
2.1.2 Civanperçemi türleri (<i>Achillea</i> sp.).....	6
2.1.2.1 <i>Achillea grandifolia</i> Friv.....	7
2.2. <i>Achillea</i> Türleri Üzerine Yapılan Araştırmalar	7
2.3. Fenolik Bileşikler	11
2.3.1 Flavonoidler	12
2.3.1.1 Flavonoidlerin sınıflandırılması	14
2.3.1.2 Flavonoidlerin farmakolojik etkileri	15
2.3.2 Flavonoid olmayan bileşikler.....	17
2.3.2.1 Fenolik asitler.....	17
2.3.2.2 Fenolik asitlerin farmakolojik etkileri.....	19
2.4. Doğal Boyarmaddeler	19
2.4.1 Doğal boyarmaddelerin sınıflandırılması.....	23
2.5. Antioksidanlar	24
2.5.1 Serbest radikaller	24
2.5.2 Antioksidanların sınıflandırılması	27
2.5.2.1. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.....	28

2.5.2.2 Reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar	29
2.5.3 Antioksidan kapasite tayin yöntemleri	30
2.5.3.1 Folin Ciocalteu fenol reaktifiyle toplam fenolik miktar tayini yöntemi ..	31
2.5.3.2 CUPRAC bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi	31
2.5.3.3 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)	31
2.5.3.4 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)	32
2.5.3.5 DPPH radikali giderme aktivitesinin tayini	34
2.5.3.6 Metal kelatı oluşturma kapasitesinin tayini	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3.1. Bitkisel Materyaller	37
3.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	37
3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler	37
3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması	37
3.2.2.1 Toplam fenolik madde miktarı tayinininde kullanılan çözeltiler	37
3.2.2.2 Toplam flavonoid miktar tayinininde kullanılan çözeltiler	38
3.2.2.3 DPPH serbest radikali giderme kapasitesinde kullanılan çözelti	38
3.2.2.4 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler (TEAC)	38
3.2.2.5 Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler (FRAP)	38
3.2.2.6 Metal kelatı oluşturma kapasitesi yönteminde kullanılan çözeltiler	39

3.2.2.7 Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler (CUPRAC)	39
3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	39
3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	40
3.4.1 HPLC çalışma koşulları	40
3.5 Sıvı Kromatografi Kuadropol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Q-TOF LC/MS)	41
3.5.1 Q-TOF LC/MS çalışma şartları	41
3.6. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE) Çalışma Koşulları	41
3.7. <i>A. grandifolia</i> Bitkisinin İçerdiği Boyarmaddelerin Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi	42
3.8. Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Ekstrelerin Hazırlanması	42
3.9. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Miktarlarının Belirlenmesi	43
3.9.1 Toplam fenolik madde miktarı tayini	43
3.9.2 Toplam flavonoid miktar tayini	44
3.10. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	45
3.10.1 Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)	45
3.10.2 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (FRAP)	46
3.10.3 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)	47
3.10.4 DPPH (2,2–difenil–1–pikrilhidrazil) radikali giderme kapasitesinin tayini	49
3.10.5 <i>A. grandifolia</i> bitkisinin metal kelatı oluşturma kapasitesinin tayini	49

3.10.6 İstatistiksel hesaplamalar.....	50
4. BULGULAR	51
4.1. Standart Maddelerin HPLC Kromatogramları ve Spektrumları	51
4.2. <i>A. grandifolia</i> Bitkisinin Farklı Kısımlarının İçerdiği Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Sistemiyle Kalitatif Analizi	59
4.2.1 Bitkinin gövde, yaprak ve çiçek kısmının hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) yöntemiyle hazırlanmış metanol ekstrelerinin HPLC sonuçları	59
4.2.2 Bitkinin yaprağından soxhlet aparatı ile hazırlanan etanol ekstresinin HPLC sonuçları	63
4.2.3 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından soxhlet aparatı ile hazırlanan etil asetat ekstresinin HPLC sonuçları	64
4.2.4 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından ASE ile hazırlanan etanol ekstrelerinin HPLC sonuçları	69
4.2.5 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından maserasyon yöntemiyle hazırlanan etanol ekstrelerinin HPLC sonuçları.....	74
4.2.6 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından soxhlet ile hazırlanan aseton ekstrelerinin HPLC sonuçları	78
4.2.7 <i>A. grandifolia</i> bitkisinin hidrolizi ve HPLC sonuçları.....	82
4.3. <i>A. grandifolia</i> Bitkisinin İçerdiği Boyarmaddelerin Ekstraksiyonu İçin Gerekli Koşulların Spektrofotometrik Olarak İncelenmesi.....	87
4.3.1 <i>A. grandifolia</i> bitkisi ile direkt doğal yün boyama işlemi.....	91
4.4. Bitkiyle Boyanmış Yünden Ekstre Edilen Boyarmaddelerin HPLC İle Analizi	91
4.4.1 Boyarmaddelerin yünden ekstre edilebilmesi için gerekli zamanın kromatografik olarak belirlenmesi.....	91

4.4.2 Boyarmaddelerin HPLC ile kalitatif analizi.....	92
4.4.3 Boyarmaddelerin HPLC ile Kantitatif Analizi	96
4.4.3.1 Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması	96
4.4.4 Bitkinin Farklı Kısımlarından Maserasyon Yöntemiyle Hazırlanan EtOH Ekstresinde Bulunan Fenolik Maddelerin HPLC İle Kantitatif Analizi.....	105
4.5. Elektrospray İyonlaşmalı Kuadrupol Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi (ESI-Q-TOF LC/MS).....	106
4.5.1 ESI-Q-TOF LC/MS analiz sonuçları	108
4.6. Bitkinin Çiçek, Yaprak ve Gövde Kısımından Hazırlanan Etanol Ekstrelerinin Antioksidan Kapasite Sonuçları.....	118
4.6.1 Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC)	118
4.6.2 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (FRAP).....	119
4.6.3 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)	120
4.6.4 DPPH radikali giderme kapasitesinin sonuçları	124
4.6.5 Bitkinin metal kelatı oluşturma kapasitesinin sonuçları	129
4.6.6 Toplam fenolik madde (TPC) miktarı tayini sonuçları	130
4.6.7 Toplam flavonoid madde (TFC) miktarı tayini sonuçları	131
4.6.8 Antioksidan kapasite yöntemleri ile toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları arasındaki ilişkinin belirlenmesi	132
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	134
6. ÖZGEÇMİŞ.....	155

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ABTS	: 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
ASE	: Hızlandırılmış solvent ekstraksiyon cihazı
BHA	: Bütilenmiş hidroksi anisol
BHT	: Butillenmiş hidroksi toluen
CH ₃ CN	: Asetonitril
CUPRAC	: Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi
di-KQA'ler	: dikafeoil kinik asit izomerleri
DAD	: Diod serili dedektör
DMF	: Dimetilformamid
DPPH [•]	: DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ESI-Q-TOF LC/MS	:Elektrospray iyonlaşmalı kuadrupol uçuş zamanlı sıvı kromatografi kütle spektrometrisi
EtOAc	: Etil asetat
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	: Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi
FT-IR	: Fourier transform IR spektrofotometresi
GC/MS	: Gaz kromatografisi / kütle spektroskopisi
GC/FID	: Gaz kromatografisi / alev iyonizasyon dedektörü
GPx	: Glutatyon peroksidaz
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC ₅₀	: Radikalin % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan madde konsantrasyonu
KAE	: Kateşin eşdeğeri
KA	: Kafeik asit
KLA	: Klorojenik asit
Nc	: Neokuproin
NO	: Azot monoksit

ROT	: Reaktif oksijen türleri
ROO [·]	: Peroksil radikali
SA	: Salisilik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBHQ	: t-bütilhidrokinon
TFA	: Trifloroasetik asit
TFC	: Toplam flavonoid bileşikler
TPC	: Toplam fenolik bileşikler
TPTZ	: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin
Troloks	: 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UV	: Ultraviyole
m/z	: kütle/yük
t _R	: Alıkonma zamanı
λ _{max}	: Maksimum dalga boyu

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	12
Tablo2.2Radikal ve radikal olmayan oksidantlardan bazılarının reaktiviteleri.....	25
Tablo 2.3 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar	29
Tablo 3.1 HPLC’de kullanılan gradient elüsyon profili	40
Tablo 3.2 Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) çalışma koşulları.....	42
Tablo 3.3 <i>A. grandifolia</i> bitkisinden elde edilen ekstraktların miktarları (g) ve % verimleri	43
Tablo 4.1 Bitkinin ekstraksiyonu için gerekli sürenin belirlenmesi.....	87
Tablo 4.2 Bitkinin ekstraksiyonu için uygun sıcaklığın belirlenmesi	87
Tablo 4.3 Bitkide bulunan boyarmaddelerin yün üzerinden ekstraksiyonu için gerekli sürenin belirlenmesi.....	91
Tablo4.4Kafeik asitin 5,0-40µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	97
Tablo 4.5 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	97
Tablo 4.6 Klorojenik asitin 5,0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	98
Tablo 4.7 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	98
Tablo4.8Rutin 5,0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	99
Tablo 4.9 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	100
Tablo4.10Luteolin 5,0-50µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	101
Tablo 4.11 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	101
Tablo4.12Kersetinin 5,0-50µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	102

Tablo 4.13 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	102
Tablo4.14Luteolin-7-O-glikozitin 10-75µg/mL kons. aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	103
Tablo 4.15 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler.....	104
Tablo 4.16 Bitkide bulunan boyarmaddelerin miktarları	105
Tablo 4.17 Bitkinin farklı kısımlarında bulunan fenolik maddelerin miktarı	105
Tablo 4.18 HPLC-DAD ve LC-QTOF/MS kullanılarak <i>A. grandifolia</i> 'nın içerdiği fenolik bileşiklerin karakterizasyonu.....	107
Tablo 4.19 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının CUPRAC değerleri (µM TEAC)	119
Tablo 4.20 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının FRAP değerleri	120
Tablo 4.21 Bitkinin farklı kısımlarının ve standartların ABTS katyon radikali süpürücü kapasite yüzdeleri (%)	121
Tablo 4.22 <i>A. grandifolia</i> bitkisinin farklı kısımlarından hazırlanan ekstrelerin ve standartların IC ₅₀ değerleri (mg/mL)	123
Tablo 4.23 Bitki ekstrelerinin TEAC değeri olarak antioksidan kapasiteleri.....	124
Tablo 4.24 Bitkinin farklı kısımlarının ve standartların DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri (%)	125
Tablo 4.25 <i>A. grandifolia</i> bitkisinin farklı kısımlarından hazırlanan ekstrelerin ve standartların IC ₅₀ değerleri (mg/mL)	129
Tablo 4.26Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının metal kelatlama yüzdeleri (%)	130
Tablo 4.27 Toplam fenolik madde miktarı (µg KAE).....	131
Tablo 4.28 Toplam flavonoid madde miktarı (mg kersetin eşdeğeri)	132

Tablo 4.29 Antioksidan kapasite yöntemleri ile toplam fenolik ve flavonoid madde arasındaki ilişki.....	133
Tablo 5.1Bitkinin farklı kısımlarında bulunan fenolikbileşikler.....	138

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Flavonoidlerin genel yapısı	13
Şekil 2.2 Flavonoidlerde bant I ve bant II'yi veren gruplar	13
Şekil 2.3 Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları. ..	14
Şekil 2.4 Flavonoidlerin sınıflandırılması	15
Şekil 2.5 Flavonoidlere antioksidan özellik kazandıran gruplar	16
Şekil 2.6 Kafeik asitin yapısı.....	18
Şekil 2.7 Kinik asitin yapısı.....	18
Şekil 2.8 Klorojenik asitin yapısı.....	18
Şekil 2.9 Salisilik asitin yapısı.....	18
Şekil 2.10 Cu(I)-Nc kelatının kimyasal yapısı	31
Şekil 2.11 Fe(III) kompleksinin Fe(II) formuna indirgenmesi.....	32
Şekil 2.12 Troloks molekülünün kimyasal yapısı	33
Şekil 2.13 ABTS kasyon radikalinin antioksidan maddelerle verdiği reaksiyon.....	34
Şekil 3.1 Katesinin Folin-Ciocalteu yöntemiyle hazırlanan kalibrasyon eğrisi.....	44
Şekil 3.2 Kersetinin kalibrasyon eğrisi.....	45
Şekil 3.3 Troloksun kalibrasyon eğrisi	46
Şekil 3.4 FeSO ₄ 'ün kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 3.5 Troloksun kalibrasyon eğrisi ve doğru denklemi	48
Şekil 4.1 Kersetageetin 3,6-dimetil eter standartının kromatogramı	51
Şekil 4.2 Kersetageetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu	51

Şekil 4.3 Salisilik asit standartının kromatogramı.....	52
Şekil 4.4 Salisilik asit standartının spektrumu.....	52
Şekil 4.5 Luteolin-7-O-glikozit standartının kromatogramı.....	53
Şekil 4.6 Luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu.....	53
Şekil 4.7 Klorojenik asit standartının kromatogramı	54
Şekil 4.8 Klorojenik asit standartının spektrumu	54
Şekil 4.9 Rutin standartının kromatogramı.....	55
Şekil 4.10 Rutin standartının spektrumu	55
Şekil 4.11 Kersetin standartının kromatogramı	56
Şekil 4.12 Kersetin standartının spektrumu.....	56
Şekil 4.13 Luteolin standartının kromatogramı.....	57
Şekil 4.14 Luteolin standartının spektrumu.....	57
Şekil 4.15 Kafeik asit standartının kromatogramı	58
Şekil 4.16 Kafeik asit standartının spektrumu.....	58
Şekil 4.17 Bitkinin gövdesinden ASE yöntemiyle hazırlanan MeOH ekstresinin kromatogramı	59
Şekil 4.18_____:t _R : 11,169 (gövde);_____:klorojenik asit standartının spektrumu ..	60
Şekil 4.19 Bitkinin yaprağından ASE yöntemiyle hazırlanan MeOH ekstresinin kromatogramı	60
Şekil 4.20_____:t _R : 11,173 (yaprak);_____:klorojenik asit standartının spektrumu .	60
Şekil 4.21 Bitkinin çiçeğinden ASE yöntemiyle hazırlanan MeOH ekstresinin kromatogramı	61

Şekil 4.22 _____:t _R : 11,231 (çiçek);_____ :klorojenik asit standartının spektrumu...61	61
Şekil 4.23 _____:t _R : 16,448 (çiçek);_____ :rutin standartının spektrumu61	61
Şekil4.24 _____:t _R :17,323(çiçek);_____ :luteolin7-O-glikozit standartının spektrumu62	62
Şekil 4.25 _____:t _R :24,212(çiçek);_____ :luteolin standartının spektrumu.....62	62
Şekil 4.26 _____:t _R :24,984(çiçek);_____ :kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu62	62
Şekil 4.27 Bitkinin yaprağından soxhlet aparatı kullanılarak hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı63	63
Şekil 4.28 _____:t _R : 11,192 (yaprak);_____ :klorojenik asit standartının spektrumu .63	63
Şekil 4.29 _____:t _R : 16,435 (yaprak);_____ :rutin standartının spektrumu.....64	64
Şekil 4.30 _____:t _R :24,988(yaprak);_____ :kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu64	64
Şekil4.31Bitkinin yaprağından soxhlet aparatı kullanılarak hazırlanan EtOAc ekstresinin kromatogramı65	65
Şekil 4.32 _____:t _R : 11,236(yaprak);_____ :klorojenik asit standartının spektrumu ..65	65
Şekil 4.33 _____:t _R : 12,239 (yaprak);_____ :kafeik asit standartının spektrumu.....65	65
Şekil 4.34 _____:t _R : 24,279 (yaprak);_____ :kersetin standartının spektrumu.....66	66
Şekil4.35 _____:t _R : 25,005(yaprak);_____ :kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu66	66
Şekil 4.36 Bitkinin çiçeğinden soxhlet aparatı kullanılarak hazırlanan EtOAc ekstresinin kromatogramı66	66
Şekil 4.37 _____:t _R :11,176(çiçek);_____ :klorojenik asit standartının spektrumu.....67	67
Şekil 4.38 _____:t _R :12,539 (çiçek);_____ :kafeik asit standartının spektrumu67	67

Şekil4.39_____:t _R :17,288(çiçek);_____ :luteolin7-O-glikozit standartının spektrumu	67
Şekil 4.40_____:t _R : 24,221(çiçek);_____ :luteolin standartının spektrumu.....	68
Şekil4.41_____:t _R :24,983(çiçek);_____ :kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu	68
Şekil 4.42 Bitkinin gövdesinden soxhlet aparatı kullanılarak hazırlanan EtOAc ekstresinin kromatogramı	68
Şekil 4.43_____:t _R : 11,363(gövde);_____ : klorojenik asit standartının spektrumu ..	69
Şekil 4.44_____:t _R : 22,104 (gövde);_____ : salisilik asit standartının spektrumu	69
Şekil 4.45 Bitkinin gövdesinden ASE kullanılarak hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı	70
Şekil 4.46_____:t _R : 11,064 (gövde);_____ : klorojenik asit standartının spektrumu .	70
Şekil4.47_____:t _R : 17,216 (gövde);_____ :luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu	70
Şekil 4.48 Bitkinin yaprağından ASE kullanılarak hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı	71
Şekil 4.49_____:t _R : 11,162 (yaprak);_____ : klorojenik asit standartının spektrumu	71
Şekil 4.50 _____:t _R : 24,214 (yaprak);_____ : kersetin standartının spektrumu.....	71
Şekil 4.51_____:t _R : 24,214 (yaprak);_____ : kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu	72
Şekil 4.52 Bitkinin çiçeğinden ASE kullanılarak hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı	72
Şekil 4.53_____:t _R : 11,138 (çiçek);_____ : klorojenik asit standartının spektrumu...	72
Şekil 4.54 _____:t _R : 16,831 (çiçek);_____ : rutin standartının spektrumu	73

Şekil4.55_____:t _R : 17,328 (çiçek);_____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu	73
Şekil 4.56 _____:t _R : 24,263 (çiçek);_____ : luteolin standartının spektrumu.....	73
Şekil 4.57_____:t _R : 25,093 (çiçek);_____:kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu	74
Şekil4.58 Bitkinin yaprağından maserasyon yöntemiyle hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı	74
Şekil 4.59 _____:t _R : 11,076 (yaprak);_____ : klorojenik asit standartının spektrumu	75
Şekil 4.60 _____:t _R : 24,204 (yaprak);_____ : kersetin standartının spektrumu.....	75
Şekil4.61_____:t _R : 24,958 (yaprak);_____ : kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu	75
Şekil 4.62 Bitkinin çiçeğinden maserasyon yöntemiyle hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı	76
Şekil 4.63_____:t _R : 11,072 (çiçek);_____ : klorojenik asit standartının spektrumu...	76
Şekil 4.64_____:t _R : 17,233 (çiçek);_____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu	76
Şekil 4.65 _____:t _R : 24,147 (çiçek);_____:luteolin standartının spektrumu.....	77
Şekil 4.66_____:t _R : 24,972 (çiçek);_____:kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu	77
Şekil4.67 Bitkinin gövdesinden maserasyon yöntemiyle hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı	77
Şekil 4.68 _____:t _R : 11,069 (gövde);_____ : klorojenik asit standartının spektrumu	78
Şekil 4.69_____:t _R : 17,241(gövde);_____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu	78

Şekil 4.70 Bitkinin çiçeğinden soxhlet kullanılarak hazırlanan aseton ekstresinin kromatogramı	79
Şekil 4.71 _____:t _R : 11,060 (çiçek); _____: klorojenik asit standartının spektrumu...79	
Şekil 4.72 _____:t _R : 12,388 (çiçek); _____: kafeik asit standartının spektrumu	79
Şekil4.73 _____:t _R :17,249 (çiçek); _____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu	80
Şekil 4.74 _____:t _R :24,123 (çiçek); _____:luteolin standartının spektrumu.....	80
Şekil 4.75 _____:t _R :24,946 (çiçek); _____:kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu	80
Şekil 4.76 Bitkinin yaprağından soxhlet kullanılarak hazırlanan aseton ekstresinin kromatogramı	81
Şekil 4.77 _____:t _R : 11,037 (yaprak); _____: klorojenik asit standartının spektrumu	81
Şekil 4.78 _____:t _R : 24,167 (yaprak); _____: kersetin standartının spektrumu.....	81
Şekil4.79 _____:t _R : 24,923 (yaprak); _____:kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu	82
Şekil 4.80 Bitkinin gövdesinden soxhlet kullanılarak hazırlanan aseton ekstresinin kromatogramı	82
Şekil 4.81 0,1 M HCl (60 °C) ile bitkinin çiçek kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı	83
Şekil 4.82 _____:t _R : 11,172 (çiçek); _____: klorojenik asit standartının spektrumu...83	
Şekil 4.83 _____:t _R : 12,568 (çiçek); _____: kafeik asit standartının spektrumu	84
Şekil 4.84 _____:t _R :24,188 (çiçek); _____:luteolin standartının spektrumu.....	84
Şekil 4.85 1,2 M HCl (60 °C) ile bitkinin çiçek kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı	84

Şekil 4.86 0,1 M HCl (60 °C) ile bitkinin yaprak kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı	85
Şekil 4.87 _____:t _R : 11,180 (çiçek);_____ : klorojenik asit standartının spektrumu..	85
Şekil 4.88 1,2 M HCl (60 °C) ile bitkinin yaprak kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı	85
Şekil 4.89 0,1 M HCl (60 °C) ile bitkinin gövde kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı	86
Şekil 4.90 1,2 M HCl (60 °C) ile bitkinin yaprak kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı	86
Şekil 4.91 _____:t _R : 8,73 (çiçek);_____ : kafeik asit standartının spektrumu	86
Şekil 4.92 <i>A.grandifolia</i> bitkisinin yapraklarıyla yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sürenin belirlenmesi amacıyla 5-45 dk sürelerle 100 °C'deki su banyosunda bekletilen ekstrenin spektrumu.....	88
Şekil 4.93 <i>A.grandifolia</i> bitkisinin gövdesiyle yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sürenin belirlenmesi amacıyla 5-45 dk sürelerle 100 °C'deki su banyosunda bekletilen ekstrenin spektrumu.....	88
Şekil 4.94 <i>A.grandifolia</i> bitkisinin çiçek kısmıyla yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sürenin belirlenmesi amacıyla 5-45 dk sürelerle 100 °C'deki su banyosunda bekletilen ekstrenin spektrumu.....	89
Şekil 4.95 <i>A. grandifolia</i> bitkisinin çiçek kısmıyla yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 50-100 °C'deki su banyosunda 30 dk bekletilen ekstrenin spektrumu.....	89
Şekil 4.96 <i>A.grandifolia</i> bitkisinin yaprak kısmıyla yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 50-100 °C'deki su banyosunda 30 dk bekletilen ekstrenin spektrumu.....	90

Şekil 4.97 <i>A.grandifolia</i> bitkisinin gövde kısmıyla yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 50-100 °C’deki su banyosunda 30 dk bekletilen ekstrenin spektrumu.....	90
Şekil 4.98 Bitkinin çiçek kısmıyla boyanmış yünün DMF ekstresinin kromatogramı	92
Şekil 4.99 (____:t _R :16,420 (çiçek); ____:rutin standartının spektrumu)	92
Şekil 4.100 (____:t _R :17,290(çiçek)____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu).....	92
Şekil 4.101 (____:t _R :24,190 (çiçek)____:luteolin standartının spektrumu)	93
Şekil 4.102 (____:t _R :24,980 (çiçek)____: kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu).....	93
Şekil 4.103 Bitkinin gövde kısmıyla boyanmış yünün DMF ekstresinin kromatogramı	93
Şekil 4.104 (____:t _R :17,317 (gövde)____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu).....	94
Şekil 4.105 Bitkinin yaprak kısmıyla boyanmış yünün DMF ekstresinin kromatogramı	94
Şekil 4.106 (____:t _R :16,494 (yaprak)____: rutin standartının spektrumu)	94
Şekil 4.107 (____:t _R :17,372 (yaprak)____: luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu).....	95
Şekil 4.108 (____:t _R :24,285 (yaprak)____: kersetin standartının spektrumu)	95
Şekil 4.109 (____:t _R :24,995 (yaprak)____: kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu).....	95
Şekil 4.110 Kafeik asitin 5,0-40 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	97

Şekil 4.111 Klorojenik asitin 5,0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	99
Şekil 4.112 Rutinin 5,0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	100
Şekil4.113Luteolinin 5,0-50µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	101
Şekil4.114 Kersetinin 5,0-50µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	103
Şekil4.115 Luteolin7-O-glikozitin 10-75µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	104
Şekil 4.116 Bitkide bulunan salisilik asit molekülünün MS spektrumu	108
Şekil 4.117 Bitkide bulunan kafeik asit molekülünün MS/MS fragmentleri	108
Şekil 4.118Bitkide bulunan klorojenik asit molekülünün MS/MS fragmentleri.....	109
Şekil 4.119 Bitkide bulunan luteolin molekülünün MS/MS fragmentleri	109
Şekil4.120Bitkide bulunan kersetagetin 3,6-dimetil eter molekülünün MS/MS fragmentleri	110
Şekil 4.121 Bitkide bulunan rutin molekülünün MS/MS fragmentleri	110
Şekil 4.123 Bitkide bulunan dikafeoil kinik asit + TFA molekülünün MS/MS fragmentleri	111
Şekil 4.124 Bitkide bulunan kersetin molekülünün MS spektrumu.....	112
Şekil 4.125Bitkide bulunan luteolin7-O-glikozit molekülünün MS spektrumu	112
Şekil 4.126 Kafeik asit molekülünün parçalanma ürünü.....	113
Şekil 4.127 Klorojenik asit molekülünün parçalanma ürünleri.....	114
Şekil 4.128 Luteolin molekülünün parçalanma ürünleri	114
Şekil 4.129 Kersetagetin 3,6-dimetil eter molekülünün parçalanma ürünleri.....	115
Şekil 4.130 Rutin molekülünün parçalanma ürünü	115

Şekil 4.131 di-O-kafeoil kinik asit molekülünün parçalanma ürünleri.	116
Şekil 4.132 Luteolin-7-O-gikozit molekülünün parçalanma ürünü.....	117
Şekil 4.133 <i>A. grandifolia</i> bitkisinde bulunan fenolik bileşenlerin molekül formülleri	118
Şekil 4.134 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının FRAP değerleri ($\mu\text{M FeSO}_4/0,2$ mg ekstre)	120
Şekil 4.135 Çiçek ekstresinin ABTS katyon radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri	121
Şekil 4.136 Yaprak ekstresinin ABTS katyon radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri	122
Şekil 4.137 Gövde ekstresinin ABTS katyon radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri	122
Şekil 4.138 Çiçek, yaprak, gövde ve standartların IC_{50} değerleri.....	124
Şekil 4.139 Çiçek ekstresinin DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri	126
Şekil 4.140 Yaprak ekstresinin DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri.....	126
Şekil 4.141 Gövde ekstresinin DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri.....	127
Şekil 4.142 BHT standartının DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri	127
Şekil 4.143 Askorbik asit standartının DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri	128
Şekil 4.144 Çiçek, yaprak, gövde ve standartların IC_{50} değerleri.....	129
Şekil 4.145 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının metal kelatlama yüzdeleri	130
Şekil 4.146 <i>A. grandifolia</i> 'dan hazırlanan EtOH ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları	131
Şekil 4.147 <i>A. grandifolia</i> 'dan hazırlanan EtOH ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarları	132
Şekil 5.1 18 ve 19. dk'larda gelen piklerin spektrumlarının kafeik asit ve klorojenik asit standartlarının spektrumları ile üst üste çakıştırılması.....	136

Şekil 5.2 Bitkide bulunan fenolik bileşiklerin kromatogramı.....139

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. *Achillea grandifolia*.....7

ÖZET

***Achillea grandifolia* Friv. Bitkisinin İçerdiği Flavonoidlerin Saptanması ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi**

Duygu Taşkın

Yrd. Doç. Dr. Dilek Bilgiç Alkaya

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Amaç: Bu doktora tez çalışmasının amacı *Achillea grandifolia* bitkisinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlanan metanol, etanol, etil asetat ve aseton ekstralarının içerdiği fenolik bileşikler analiz etmektir. Ayrıca bitkinin bu kısımları ile yapılan doğal yün boyama sonrası yün üzerinden ekstre edilen boyarmaddelerin kalitatif ve kantitatif olarak analizini gerçekleştirmek ve bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlanan etanol ekstralarının farklı yöntemlerle antioksidan kapasitelerini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Bitkinin içerdiği fenolik bileşikler analiz etmek amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyod dedektör (HPLC-DAD) ve sıvı kromatografi kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (LC-QTOF/MS) yöntemleri kullanıldı. Bitkinin içerdiği doğal boyarmaddelerin kalitatif ve kantitatif analizleri HPLC-DAD yöntemi ile yapıldı. Bitkinin farklı kısımlarından hazırlanan etanol ekstralarının antioksidan kapasiteleri, bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC), demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (FRAP), troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali giderme kapasitesinin tayini ve metal kelatı oluşturma kapasitesi yöntemleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelendi. Ayrıca bitkinin taşıdığı toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları kateşin ve kersetine eşdeğer olarak tayin edildi.

Bulgular ve Sonuçlar: *A. grandifolia* bitkisinin flavonoidlerden kersetagetin 3,6-dimetil eter, luteolin-7-O-glikozit, rutin, kersetin, luteolin; fenolik asitlerden kafeik asit, salisilik asit, klorojenik asit ve dikafeoil kinik asitlerini içerdiği tespit edildi. Ayrıca bitkinin farklı kısımlarının antioksidan kapasiteleri karşılaştırmalı olarak ilk kez tarafımızdan incelendi.

Anahtar Sözcükler: *Achillea grandifolia*, doğal boyarmadde, fenolik bileşikler, LC-QTOF/MS, antioksidan kapasite.

SUMMARY

Identification of Flavonoid Compounds and Investigation of Antioxidant Activity of *Achillea grandifolia* Friv.

Duygu Taşkın

Thesis Advisor: Asst. Prof. Dilek Bilgiç Alkaya

Department of Analytical Chemistry

Aim: The aim of this thesis is the analysis of the phenolic compounds of *Achillea grandifolia* flowers, leaves and stems after extraction with methanol, ethanol, ethyl acetate and acetone. Wool dyeing properties of the parts of this plant were examined by the identification and quantification of the dyestuffs in the extracts of dyed wool. The ethanolic extract of flowers, leaves and stems were examined using various antioxidant capacity methods.

Materials and Methods: Liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-QTOF/MS) and HPLC-DAD methods were used for identification of the phenolic compounds of different parts of plant. Natural dyestuffs of plant were analysed by HPLC-DAD. The ethanolic extracts of different parts of the plant were examined using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and metal chelating capacity methods. Also, total phenolic and total flavonoid contents of ethanolic extract were determined as catechin and quercetin equivalents.

Results and Conclusions: *A. grandifolia* contain quercetagenin 3,6-dimethyl ether, luteolin-7-O-glucoside, rutin, quercetin and luteolin as flavonoids, caffeic acid, salicylic acid, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids as phenolic acids. The antioxidant capacity of the plant was investigated for the first time.

Key Words: *Achillea grandifolia*, natural dyestuff, phenolic compounds, LC-QTOF/MS, antioxidant capacity.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tarihin çok eski dönemlerinden beri doğadaki bazı bitki, böcek, deniz kabuklularının ve metal oksitlerinin boyama ve pigment yapımında kullanıldığı bilinmektedir (Enez, 1987). XIX. yüzyıl ortalarına kadar tekstil boyamada kullanılan başlıca renklendiriciler bu doğal boyarmaddelerdi. Fakat 1856 yılında William Henry Perkin tarafından ilk sentetik boyarmadde olan moveinin bulunmasıyla birlikte doğal boyarmaddelerden sentetik boyarmaddelere doğru bir yönelme olmuştur. XIX. yüzyılın ikinci yarısında bir yandan yeni boyarmaddeler bulunurken öte yandan bitkilerdeki boyarmaddelerin sentezi gerçekleşmiştir. Boyarmaddelerin büyük miktarlarda ve ucuz olarak sentezi XIX. yüzyılın sonunda doğal boyamacılığı büyük ölçüde ortadan kaldırmıştır (Çakalgöz ve Eltez, 2014). Ancak son yıllarda çevreye gösterilen hassasiyet sentetik boyalara göre çevre açısından ve insan sağlığı açısından daha güvenilir olan doğal boyalara karşı olan ilgiyi tekrar arttırmıştır.

Bitkisel boyarmaddeler, doğada yetişen otsu ya da çalı türü bitkilerin kök, kabuk, yaprak, çiçek ya da tohumlarından çeşitli yöntemlerle elde edilen boyarmaddelerdir (Mert ve Başlar, 1992). Ülkemizde bitkisel boyarmadde kaynağı olarak, yosunlar ve likenler, otlar, çalılar, ağaçcıklar, yumrular, kökler ve ağaçlar gibi pek çok bitki bulunmaktadır (Ölmez, 2005). Günümüzde sentetik boyarmaddelerin insan sağlığına zarar verdiği bilindiğinden doğal boyarmaddelere olan talep tüm Dünyada artış göstermektedir.

Oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, hücre solunumu ve normal metabolizma olayları sırasında sağlık açısından son derece zararlı olan reaktif oksijen türlerini oluştururlar. Aerobik organizmalarda bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olan antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır (Kopani ve ark., 2006). Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu zararı ya yok eder ya da azaltırlar. Bu savunma sistemlerinin, oksidan madde karşısında yetersiz kaldığı durumlarda ise dışarıdan antioksidan etkili maddelerin alınması gerekmektedir. Sentetik antioksidanların prekarsinojen lezyonlara ve kansere neden olan ko-karsinojen gibi etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Örneğin, gıda katkı maddesi olarak kullanılan butillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve butillenmiş hidroksi toluenin (BHT) kronik ürtikerde alevlenmelere neden olduğu bazı araştırmacılar tarafından

açıklanmıştır (Çalışır ve Çalışkan, 2003). Bu nedenle zararlı olduğu bilinen sentetik antioksidanların yerine doğal antioksidan kaynaklarının kullanımı sağlık açısından önem kazanmaktadır.

Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. *Achillea* türü bitkiler de, tarihte Yunan savaşçı Achilles'in Truva Savaşı sırasında yaralanan askerlerini iyileştirmesi amaçlı kullanılmıştır. Bu nedenle *Achillea* cinsi adını Achilles'den almıştır (Issabeagloo ve ark., 2012). Roma imparatorluğu zamanında yaşamış Yunanlı hekim Dioscorides *Achillea* türlerini dizanteri için kullanmıştır. Ayrıca Çin tıbbında *Achillea* türleri diaforetik, tonik ve anti-hipertansiyon olarak kullanılır. *Achillea* türleri Anadolu'nun en önemli yerli bitkileri arasındadır ve bu bitkilerden hazırlanan çay karın ağrısı ve gaz giderici olarak kullanılmaktadır (Saeidnia ve ark., 2011).

Achillea türlerinin analjezik ve antienflamatuar, eritrosit ve lökosit koruyucu (Demirci ve ark., 2009); antispazmodik (Karamenderes ve ark., 2003); antioksidan ve antimikrobiyal (Turkoğlu ve ark., 2010); antihelmintik, antialerjik, kolagog, antibakteriyel (Moradkhani ve ark., 2011); antiülser, karaciğer koruyucu ve anksiyolitik (Applequist ve Moerman, 2011) etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca *Achillea* türleri içerdikleri flavonoidlerinden dolayı doğal boyamacılıkta kullanılabilir (Kiumarsi ve ark., 2009). Bu familyada uçucu yağ, inülin ve lateks en sık rastlanan bileşiklerdir. Ayrıca seskiterpen laktonlar, alkaloidler (senecio), esterler (piretrinler); saponozitler ve kumarinlere de bu familyada saptanmıştır. İçerdikleri bileşikler nedeniyle *Achillea* türü bitkilerin çoğu eczacılıkta, gıda endüstrisinde ve lateksinden dolayı da diğer sanayi alanlarında kullanılmaktadır (Tanker ve ark., 2007).

Achillea grandifolia bitkisi üzerinde yapılan literatür taramasında herhangi bir antioksidan kapasite ve boyarmadde analizi çalışmalarına rastlanılmamıştır. Bu doktora tez çalışmasında ilk olarak *A. grandifolia* bitkisinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının içerdiği fenolik maddelerin HPLC ile analizi, daha sonra bitkinin bu kısımlarıyla yün boyamalarında hangi boyarmaddelerin yüne tutunduklarının saptanması ve boyama sonrası yün üzerinden ekstre edilen boyarmaddelerin HPLC-DAD sistemi ile kantitatif olarak belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca bitkinin çiçek, gövde ve yaprak kısımlarından hazırlanan etanol ekstrelerinin toplam fenolik ve

toplam flavonoid miktarları belirlenerek, bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC), demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (FRAP), troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali giderme kapasitesinin tayini ve metal kelatı oluşturma aktivitesi yöntemleri kullanılarak bitkinin antioksidan kapasitesinin saptanması ve böylece doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilmesinin araştırılması ve bitkinin çiçek, yaprak ve gövdesinden maserasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan etanol ekstralarının taşıdığı fenolik bileşiklerin HPLC sistemiyle kalitatif ve kantitatif analizleri yapılarak fenolik bileşikler ile antioksidan kapasite arasındaki ilişkinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1 Asteraceae (Compositae) familyası

Yeryüzünde 1000'e yakın cins ve 20.000 kadar tür ile temsil edilen, çiçekli bitkilerin en zengin familyasıdır. Yurdumuzda 130 kadar cinsi, 1100 den fazla türü yetişmektedir (Tanker ve ark., 2007).

Bitkilerin çoğu otsudur, çalı veya ağaç formunda olanların sayısı azdır. Yapraklar ya alternan veya oppozit dizilmiş ya da hepsi tabandadır. Çiçekleri, kapitulum denilen çiçek durumunda toplanmışlardır. Etraflarında çanak yapraklarına benzeyen braktelerden meydana gelen ortak bir brakte örtüsü (involukrum) bulunur. Kapitulumlarda tek çiçekler kurs şeklinde yassılaştırmış veya konimsi yükselmiş ekzen tepesinde toplanmışlardır. 5 parçalı olan çiçeklerin şekilleri çok değişik olmakla beraber, erdişi veya bir cinsli aktinomorf veya zigomorftur. Çanak yaprakları, yaprak şeklinde gelişmez, ya tüy ya da pul şeklini alarak "Papus" meydana getirir. Taç yaprakları 5 gamopetalden meydana gelir. Erkek organlar 5, serbest, filamentleri taç yaprakları ile birleşmiştir. Ovaryum 2 karpelli, alt durumlu ve bir tohum taslaklıdır. Meyva akendir. Familya bitkilerinin çoğu Compositae tipi salgı tüyü ve örtü tüyleri taşır (Karamanoğlu, 1977).

2.1.2 Civanperçemi türleri (*Achillea* sp.)

Achillea türleri kapitulumları küçük, orta çiçekleri tubular, kenar çiçekler ligulat çok yıllık otsu bitkilerdir (Karamanoğlu, 1977). *Achillea* cinsinin, Türkiye florası'nda 5 seksiyonda toplanmış 58 takson ile temsil edilen 50 türü bulunur. Bunların 31'i Anadolu'ya endemiktir. Ülkemizde civanperçemi, pireotu, yılan çiçeği, ormaderen, büyücan, kılıçotu ve çoban kirpiği olarak bilinir. *Achillea* türleri seskiterpen lakton, lignan ve flavonoid içeriği bakımından oldukça zengindirler (Ertaş ve ark., 2014).

2.1.2.1 *Achillea grandifolia* Friv.



Bitki ince rizomlu, rizomlar sürünücü. Gövde 40-100 cm, gür, dik, tek ya da birkaç tane, düz, dallanmamış ya da yukarı doğru hafifçe dallanmış, silindirik, boyuna çizgili, pubesent. Yapraklar homomorfik, oblong'dan genişçe ovat'a kadar, 8-13 x 3-8 cm, tek düzlemlî, sapsız, derince pinnatifid'ten pinnatisekt'e kadar, segmentler 4-6 çift, 1,5-5 x 0,5-2 cm, oblong'dan lanseolat'a kadar, loplara bölünmüş, loplar kuneat'dan lanseolat'a kadar, subakut, pubesent ve ± nokta şeklinde salgılı. Çiçek durumu sapı 2-6 mm.

Resim 1. *Achillea grandifolia* (www.rightplants4me.co.uk, Erişim Tarihi: 21 Şubat 2015)

Kapitulum 80-200 ya da daha fazla, korimbus 5-11 mm genişliğinde. İnvolutrum oblong'dan genişçe obovoid'e kadar, 3,5-4,5 x 2,5-3 mm. Fillariler 4 sıralı, soluk renkli, pubesent; dıştakiler lineer-lanseolat, 1,5-2 x 0,5-0,7 mm, akut, darca şeffaf kenarlı; içtekiler oblong, 3,5 x 1 mm, akut'dan obtus'a kadar. Palea lanseolat, 3-3,5 x 0,7 mm, akut, zarsı, şeffaf kenarlı, piloz. Dilsî çiçekler 4-5 adet, beyaz, 4-5 x 2- 2,5 mm, lamina yarı eliptik, 1,5-3 x 1-2,5 mm, uç kısmı hafifçe 3 krenat; tüpsü çiçekler yaklaşık 10-20 adet, sarı, 3 x 0,5 mm, ovaryum 1,5 mm. Aken oblong-oblanseolat, 1,5-1,75 x 0,5 mm, punktata, kahverengimsidir (Arabacı, 2006).

2.2. *Achillea* Türleri Üzerine Yapılan Araştırmalar

Achillea millefolium bitkisinden kastingin izole edilmiş ve bu etken maddenin anti-tümör etki gösterdiği ispatlanmıştır (Haidara ve ark., 2006). Başka bir çalışmada apigenin, apigenin-7-O-glukozit, luteolin, luteolin-7-O-glukozit ve rutin içerdiği kromatografik yöntemlerle ispatlanmıştır (Kocevar ve ark., 2008). Ayrıca *Achillea*

millefolium bitkisinin antihemorajik, analjezik, kontraseptif, abortif, emenagog ve antispermatojenik etkisinin olduğu da *in vivo* olarak ispatlanmıştır (Montanari ve ark., 1998).

Achillea clavennae türünde flavonollerden sentaureidin, penduletin, kastisin ve artemetin; guanalooid halkası taşıyan artesanin ve 9- α -asetoksi-artesanin gibi 8 tane seskiterpen lakton bileşiği; lignanlardan sesamin ve kumarinlerden de isofraksidin bileşikleri izole edilmiştir (Trifunovic ve ark., 2006).

Achillea depressa bitkisinden seskiterpen lakton ve flavonoid (salvigenin sirsimaritin) bileşikleri izole edilmiştir (Trifunovic ve ark., 2004).

Achillea falcata bitkisinden 3- β metoksi-iso-seko-tanapartholid, tanafillin, iso seko-tanapartholid ve 8-hidroksi-3-metoksi-iso-seko-tanapartholid seskiterpen lakton bileşikleri izole edilmiştir (Ghantous ve ark., 2009). Ayrıca başka bir çalışmada bu bitkinin topraküstü kısmından monoterpen bileşikler olan 3,7-dihidroksi-3,7-dimetil-1,5-oktadien ve 3,6-dihidroksi-3,7-dimetil-1,7-oktadien; seskiterpen lakton bileşik olan sintenin ve flavonoid bileşikler olan 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon ve 5-hidroksi-6,7,8,3',4'-pentametoksiflavon bileşikleri izole edilmiştir (Bruno ve ark., 2003).

Achillea sibirica subsp. *mongolica* bitkisinden kersetin-3-O-glikozit, salvigenin, 6-hidroksi kamferol 3,6,7,4'-tetrametileter, kersetagetin 3,6,7,4'-tetrametileter, kersetagetin 3,6,7,3',4'-pentametileter; *Achillea latiloba* bitkisinden ise 6-hidroksi kamferol 3,6,4'-trimetileter, kersetagetin 3,6,4'-trimetileter, kemferol 3,4'-dimetileter, kersetin 3,3'-dimetileter izole edilmiştir (Vetschera ve Wollenweber, 1999).

Achillea ageratum bitkisinden 5,4'-dihidroksi-3,7-dimetoksiflavon, penduletin krisosplenetin, hispidulin ve ageratriol türevleri izole edilmiştir (Vieira ve ark., 1997).

A. setacea türünden visenin-2, isoşaftosid, şaftosid, viteksin, orientin, izoorientin, rutin ve luteolin-7-O-glikozit, apigenin-7-O-glikozit ve apigenin izole edilmiştir (Marchart ve Kopp., 2003).

Achillea nobilis bitkisinin metanol ekstresinden orientin, izoorientin, viteksin, izoşaftosid, luteolin-7-O- β -glukuronid, luteolin-4'-O- β -glukopiranosid, luteolin-6-C-apiofuranosil-(1'' \rightarrow 2'')-glukopiranosid, kersetin-3-O-metileter, kersetin-3-O-metileter-7-O- β glukopiranosid, kersetin-3-O-[α -arabinopiranosil-(1''' \rightarrow 6'')- β -glukopiranosid] izole edilmiştir (Krenn ve ark., 2003).

Achillea crithmifolia, *Achillea clypeolata* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından ve *Achillea distans* bitkisinin çiçek başlarından terpenoit, seskiterpen ve seskiterpen lakton bileşikleri çeşitli kromatografik metotlar ile izole edilmiştir (Todorova ve ark., 1998; Todorova ve ark., 2007).

Achillea roseo-alba ve *A. collina* bitkilerinden 8 α -asetoksi-(ahillisin), 8 α -angeloksi- ve 8 α -tigloksi-3-oksa-10-epi-artabsin bileşikleri; *Achillea millefolium* bitkisinden de 8-asetil- ve 8-angeloilgelolid bileşikleri izole edilmiştir (Blay ve ark., 2000).

A. ligustica bitkisinden matrikarin, 5-hidroksi-5,6-sekokaryofillen-6-on ve bir stereoisomer seskiterpen guaianolide (3 α -kloro-4 β , 10 β -dihidroksi-1 β , 2 β -epoksi-5 α ,7 α H-guai-11(13)-en-12,6 α -olid izole edilmiştir (Mahmoud ve ark., 2012).

Achillea vermicularis bitkisinde ahilleanon, vermikulon, vermikularon, oleonolik asit, β -sitosterol, β -amirin bileşikleri izole edilmiş ve NMR ile yapıları belirlenmiştir (Ahmad, 2005).

A. collina ve *A. pratensis* türlerinin içerdiği seskiterpen laktonlar için yeni bir HPLC-UV metodu geliştirilmiştir. *A. collina* türünün apolabil proazulen, *A. pratensis* türünün de polar ödesmanolid içerdiği saptanmıştır (Glasl ve ark., 2002).

Achillea millefolium subsp. *millefolium* Afan. türünün metanol ekstresi ve uçucu yağlarının *in vitro* olarak antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bitkiden elde edilen uçucu yağından GC-MS ile 36 tane bileşik (majör madde olarak ökaliptol, kamfor, α -terpineol, β -pinen, ve borneol) bulunmuştur (Candan ve ark., 2003).

Achillea collina Becker ex Rchb türünden klorojenik asit ve 3,5 ve 4,5-di-O-kafeoil kinik asit içerdiği HPLC sistemi ile belirlenmiştir ve bu asitlerin DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali üzerine antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır (Giorgi ve ark., 2009).

Achillea ligustica bitkisinin vejetatif ve çiçek kısımlarının uçucu yağları gaz kromatografisi / alev iyonizasyon dedektörü (GC/FID) ve GC-MS ile incelenmiş ve fazla miktarda linalol, viridiflorol, β -pinen, 1,8-sineol ve terpinen-4-ol bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada uçucu yağların DPPH, ABTS radikal süpürücü ve β -karoten ağartma metodu ile antioksidan etkisi ve mikro-dilüsyon yöntemi ile de antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve güçlü bir aktiviteye sahip olduğu ispatlanmıştır (Maggi ve ark., 2009).

Achillea biebersteinii ve *A. wilhelmsii* türlerinin ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş ve gram pozitif, gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi çalışılmıştır. Bu bitkilerin belli pH'daki metanol ekstratlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları sırasıyla gallik asit ve kateşin referansına karşı verilmiş, ayrıca DPPH antioksidan etkisine de bakılmıştır (Bashi ve ark., 2012).

Başka bir çalışmada, Elazığ'da doğal olarak yetişen iki *Achillea* L. (*Achillea wilhelmsii* ve *A. schischkinii*) türünden su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağlar GC ve GC-MS ile analiz edilmiştir. *Achillea wilhelmsii*'de ana bileşenler olarak kamfen (% 7,9), 1,8-sineol (% 6,6), kamfor (% 48,2), borneol (% 10,3) ve 3-sikloheksan-1-ol (% 14,2) bileşikleri analiz edilmiştir. *A. schischkinii* bitkisinde ise, 1,8-sineol (% 14,5), linalool L (% 8,9), kamfor (% 12,9), isosiklositral (% 7,6), borneol (% 10,9) ve karyofillen oksit (% 6,3) bileşikleri tespit edilmiştir (Bağcı ve ark., 2008).

Achillea türü bitkilerin fitokimyası ve tıbbi özellikleri üzerine bir derleme çalışması yapılmış ve bu türlerin flavonoidler, fenolik asitler, kumarinler, terpenoidler ve steroller içerdiği tespit edilmiş ve bu türlerin yara iyi edici, östrojenik, antidiyabetik, antispermatojenik, antiülser, sitotoksik, antispazmodik, antiinflamatuvar etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak kanıtlanmıştır (Saeidnia ve ark., 2011).

2.3. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler aromatik halkaya direkt bağlı bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren aromatik bileşiklerdir. Bu tanıma göre en basit fenolik maddenin bir hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin benzenden türediği bilinmektedir.

Fenolik bileşikler genellikle zayıf asitlerdir. Doymamış alifatik alkollerde bulunan -OH grubu ile fenolik -OH grupları kıyaslandığında fenolik -OH gruplarının daha asidik olduğu görülmektedir. Yani fenoller alkollerden daha asidiktir. Bu sebeple fenolde bulunan -OH grubundan bir proton ayrılmasıyla oluşan fenoksit iyonu üzerindeki negatif yük delokalizasyonu (konjügasyonu) sonucu birçok mezomerik yapının oluşumudur. Alkollerde böyle bir delokalizasyon mümkün olmamaktadır. Sonuç olarak fenoller, pKa'sı 16-19 olan alifatik alkoller ile pKa'sı 4-5 olan karboksilik asitlerin arasında yer alan, pKa'sı 10 olan zayıf bir asittir (Vermerris ve Nicholson, 2006).

Bitkilerin temel bileşiklerinden olan fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup, bitki aleminde 8000'den daha fazla fenolik yapının varlığı bilinmektedir (Tsao, 2010). Fenolik maddeler bitkilerin yaprak, gövde, çiçek ve meyve gibi canlı dokularında glikozitler şeklinde, odunsu dokularında aglikonlar şeklinde çekirdeklerinde ise her iki formda da bulunmaktadır (Yıldız ve Baysal, 2010).

Tablo 2.1'de görüldüğü üzere fenolik bileşikler karbon iskeletlerine göre flavonoidler ve flavonoid olmayan bileşikler olmak üzere iki gruba ayrılır. Flavonoidler, C₆-C₃-C₆ iskeletiyle karakterize edilir ve heterosiklik yapı farklılıklarına göre sınıflandırılırlar. Örnek olarak flavonol, flavon, flavanon, flavanol, antosiyanidin ve isoflavonlar verilebilir. Flavonoid olmayanlar ise çok daha fazla çeşitlilik göstermekte ve basit fenoller, hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler, kumarinler ve diğerleri örnek olarak verilebilir.

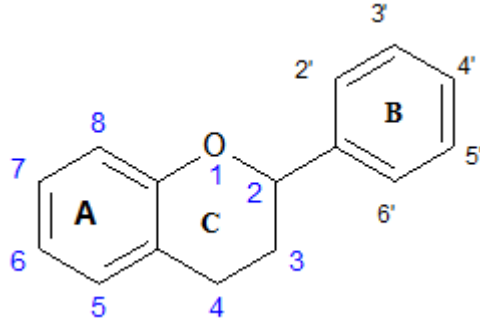
Tablo 2.1 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Lallemand ve ark., 2012).

	Karbon iskeleti	Bileşik sınıfı
Flavonoid Olmayan Bileşikler	C ₆	Basit fenoller
	C ₆ -C ₁	Hidroksibenzoik asitler
	C ₆ -C ₂	Asetofenonlar, fenilasetatlar
	C ₆ -C ₃	Hidroksisinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler,
	C ₆ -C ₄	kromonlar
	C ₆ -C ₁ -C ₆	Naftakinonlar
	C ₆ -C ₂ -C ₆	Ksantonlar
	(C ₆ -C ₃) ₂	Stilbenler, antrakinonlar
	(C ₆) _n	Ligninler
	(C ₆ -C ₁) _n :Glikoz	Kateşol melaninler
(C ₆ -C ₃) _n	Hidrolize tanenler	
Flavonoid Bileşikler	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoller
	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonlar
	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavanonlar
	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavanoller
	C ₆ -C ₃ -C ₆	Antosiyanidinler
	C ₆ -C ₃ -C ₆	İsoflavonlar
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidler
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Kondanse tanenler (kateşin polimerler, proantosiyanidinler)

2.3.1 Flavonoidler

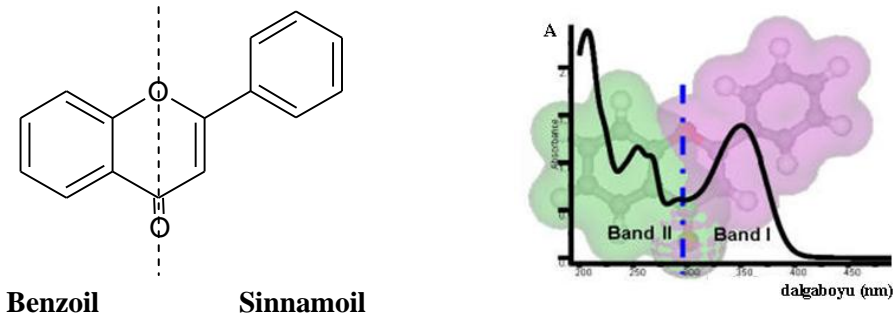
Flavonoidler sarı renkli olmaları nedeniyle latince “sarı” anlamına gelen “flavus” sözcüğünden adını almışlardır (Kahraman, 2002). Flavonoidler iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan difenilpropan (C₆-C₃-C₆) iskeletine sahip, doğal kaynakların en geniş sınıfını oluşturan bileşiklerdir. Şu ana kadar 6000’in üzerinde farklı yapıda flavonoid belirlenmiştir ve bu sayı gün geçtikçe de artmaktadır (Marais, 2006).

Flavonoidler A ve B olmak üzere 2 benzen halkası içerirler ve bu benzen halkaları oksijen içeren ve bir piren halkası olan C halkası ile birbirine bağlanırlar (Erlund, 2004). Bu halkalara bağlanan çeşitli fenolik hidroksil grupları, bu yapıların antioksidan aktivite göstermelerini sağlar. Farklı türdeki bitkilerde veya aynı bitkinin değişik kısımlarında bulunan flavonoidlerin büyük yapısal farklılıkları vardır (Rijken ve ark., 2005). Şekil 2.1’de bir flavonoid grubunun genel yapısı görülmektedir.



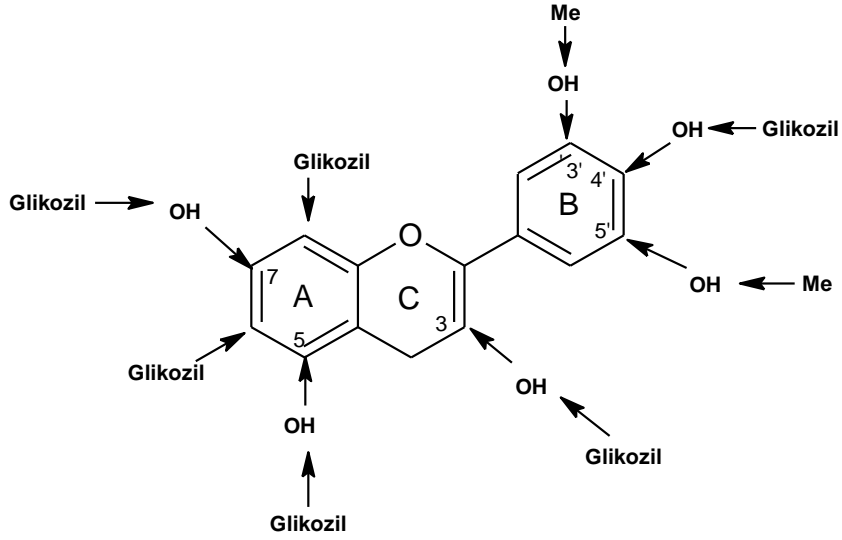
Şekil 2.1 Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidler, UV spektrumunda, biri uzun diğeri kısa dalga boyunda olmak üzere iki absorpsiyon bandı göstermektedir (Şekil 2.2). Bant I uzun dalga boyundadır ve bu band B halkasıyla yani sinnamoil grubu ile ilgilidir. Bant II ise daha kısa dalga boyundadır ve flavonoid yapısında bulunan A halkası yani benzoil grubu ile ilişkilidir. A ve B halkasına bağlanan substituentler absorpsiyon bantlarında batokromik ve hipsokromik kaymaya sebep olurlar ve bu farklılık flavonoidlerin yapılarının aydınlatılmasında kolaylık sağlamaktadır (Gattuso, 2007).



Şekil 2.2 Flavonoidlerde bant I ve bant II'yi veren gruplar

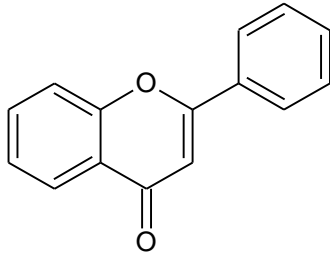
Flavonoidlerin yapısında en yaygın hidroksil substituenti bulunur ve genellikle bu hidroksit grupları 3, 5, 7, 3', 3, 4' ve/veya 5' pozisyonlarında metillenir, asetillenir, sülfatlanır veya prenilenir. Bitkilerde flavonoid glikozitleri O veya C glikoziti şeklinde bulunurlar: O glikozitler doğada C glikozitlere göre daha yaygındır. Flavonoid O glikozitler, aglikonun bir veya daha fazla hidroksil grubuna şekerlerin bağlanmasıyla oluşurlar ve bu glikozit türleri genellikle C-3 ve C-7 pozisyonlarında bulunan hidroksil gruplarına bağlanırlar. C-glikozitler ise, aglikonun karbonuna bağlanan şekerleridir ve genellikle bu şeker molekülleri C-6 ve C-8 pozisyonlarına bağlanırlar (Şekil 2.3) (Rijke, 2006; Lakhanpal, 2007).



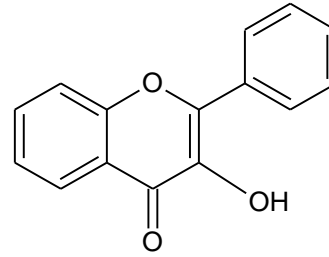
Şekil 2.3 Flavonoid yapılarında substituentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları (Marais, 2006; Harmandar ve Bilaloğlu, 2006).

2.3.1.1 Flavonoidlerin sınıflandırılması

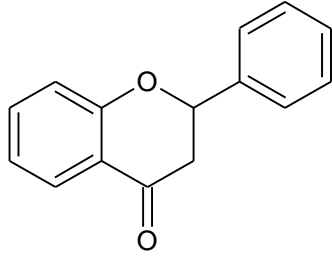
Flavonoidlerde bulunan fenil halkalarının propan zincirine farklı konumlardan bağlanmasıyla ve bağlanma sonucunda propan zincirinin farklı şekillerde halkalaşması ile flavonoidler alt sınıflara ayrılırlar. Alt sınıflara ayrılan flavonoidlerin bu gruplar içerisinde çeşitlenmesi ise fenil gruplarına bağlanan metil ve hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu ile olmaktadır. Şekil 2.4'te flavonoidlerin alt gruplarının formülleri verilmiştir (Harmandar ve Bilaloğlu, 2006).



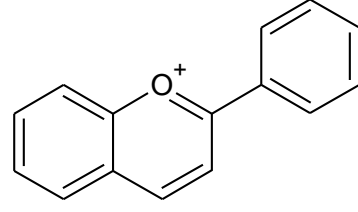
Flavon



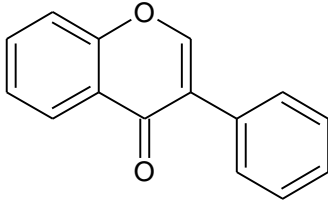
Flavonol



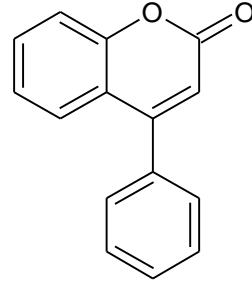
Flavanon



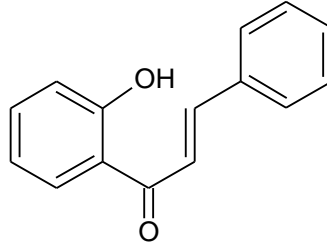
Antosiyanidin



İsoflavon



Neoflavonoid



Kalkon

Şekil 2.4 Flavonoidlerin sınıflandırılması

2.3.1.2 Flavonoidlerin farmakolojik etkileri

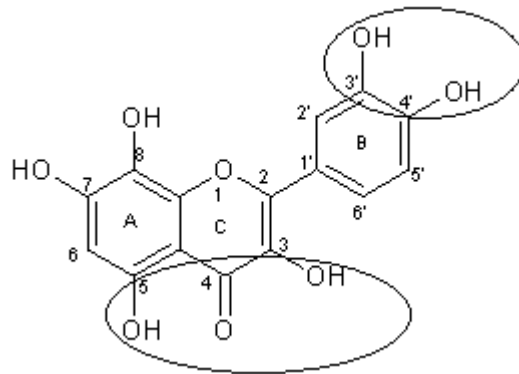
Flavonoidlerin antioksidan, diüretik, antidiyabetik, hepatoprotektif, antispazmodik, östrajenik, antimitojenik, antimikrobiyal ve kardiyovasküler sistem üzerine (damar genişletici) etkileri olduğu kanıtlanmıştır (Yağcı ve ark., 2008). Flavonoidlerin aynı zamanda antiviral, anti-inflamatuvar, antialerjik etki gösterdiği saptanmıştır (Cook ve Samma, 1996).

Bitkilerde bulunan flavonoid ve fenolik asitlerin antihepatotoksik, antiosteoporotik, antiülser, immunomodülatör, antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Plazonic ve ark, 2009).

Yapılan başka bir çalışmada enginarada bulunan flavonoidlerden luteolin, sinarozit, skolimozit, sinarotriozitin idrar söktürücü ve safra düzenleyici etkisi olduğu belirtilmiştir (Meriçli, 1989).

Flavonoidlerin farmakolojik etkileri üzerine bir derleme yapılmış ve flavonoidlerin nörodejeneratif rahatsızlıklarda kullanıldığını, antibakteriyal, antialerjik, sitotoksik, antitümör ve vasodilatör etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin lipid peroksidasyonunu, trombosit çökmesini, kapiler permeabilitesini ve kırılabilirliğini, siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimlerini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Sandhar ve ark., 2011).

Flavonoidler aynı zamanda önemli antioksidan kaynaklarıdır. Flavonoidler süperoksit radikalini, hidroksil radikalini ve singlet oksijeni temizler, peroksil radikalini ve alkoksil radikalini yakalar, lipid peroksil zincirini kırar. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe eder. Demir ve bakır gibi geçiş metalleri ile kelat oluşturur. Protein kinaz enzimini inhibe eder ve laktat transportunu engeller. Flavonoidlere bu antioksidan özelliği B halkasındaki o-dihidroksi (kateşol) grubu, C halkasındaki 4-okzo grubu ile elektron delokalizasyonu için gerekli olan 2-3 çifte bağı ve son olarak da 3 ve 5 pozisyonlarında bulunan, radikal yakalama kapasitesi yüksek ve metalleri kelatlamaya yarayan hidroksil gruplarından ileri geldiği söylenmektedir (Şekil 2.5) (Kahraman, 2002).



Şekil 2.5 Flavonoidlere antioksidan özellik kazandıran gruplar

Hidroksil gruplarının düzenlenmesindeki değişiklik ve hidroksil gruplarına glikozit yapılarının bağlanması flavonoidlerin antioksidan aktivitelerini düşürmektedir. Flavonollerle ilgili yapılan bir çalışmada kersetinin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Ancak, kersetinin 3-hidroksil grubuna rutinoz şekerinin bağlanmasıyla oluşan rutin oldukça düşük aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise kersetin, siyanidin, pelargonidin ve peonidin glikozit yapılarının aglikonlarından daha düşük aktiviteye sahip olduğu ve eklenen ikincil glikozit yapılarının aktiviteyi daha fazla azalttığı bulunmuştur. Antioksidan etkinin bu azalışı karbonhidrat kısmının sebep olduğu sterik etkiyle açıklanmaktadır (Şahin, 2011).

2.3.2 Flavonoid olmayan bileşikler

2.3.2.1 Fenolik asitler

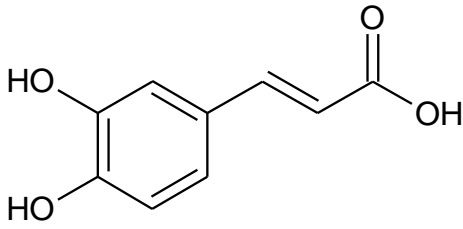
Doğal olarak oluşan fenolik asitler bir aromatik halka ve 3 karbon yan zincirine bağlı fenilpropanoid sınıfı bileşiklerdir. Fenolik asitler çoğunlukla serbest halde bulunmayıp, bu asitlerin karboksil grupları aminoasitler, karbonhidratlar, glikozitler veya proteinlerle reaksiyona girer. Ayrıca fenolik asitlerin fenolik hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluşturmaktadırlar (Plazonic, 2009).

Bitkilerde bulunan fenolik asitlerin belirlenmesi amacıyla; sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), ince tabaka kromatografisi (İTK) ve kapiler elektroforez (CE) gibi pek çok teknik uygulanmıştır. Bununla birlikte ters faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC) fenolik asit analizinde kullanılan en yaygın yöntemdir.

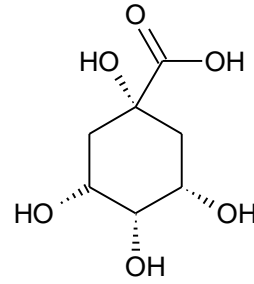
Fenolik asitler, sinamik asitler (hidroksisinnamik asitler) ve benzoik asitler (hidroksibenzoik asitler) olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Hidroksisinnamik asitler C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan -OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).

Hidroksisinnamik asitler hemen hemen her bitkide bulunan fenolik bileşiklerin büyük bir sınıfını oluştururlar (Plazonic ve ark., 2009). Birçok bitkide bir

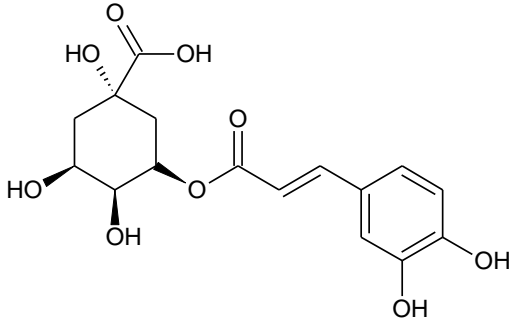
hidroksisinnamik asit olan klorojenik asit ve klorojenik asitin farklı alt grupları ile izomerleri bulunmaktadır (Clifford ve ark., 2006). Klorojenik asit, kafeik asit ve kinik asitin esteridir (Şekil 2.8). Birçok bitki kinik asit kısmının 3, 4 ve 5 pozisyonlarının esterleşmesi ile klorojenik asit üretir, 1 konumundaki esterleşmeye az rastlanır, fakat bazı Asteraceae familyasına ait türlerde 1-açıl klorojenik asit bulunmuştur (Plazonic ve ark., 2009). Kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit, rosmarinik asit gibi asitler hidroksisinnamik asitler grubuna örnek olarak verilebilir (Perrone ve ark., 2008).



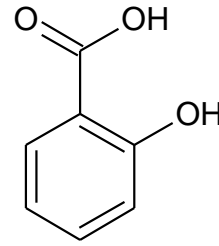
Şekil 2.6 Kafeik asitin yapısı



Şekil 2.7 Kinik asitin yapısı



Şekil 2.8 Klorojenik asitin yapısı



Şekil 2.9 Salisilik asitin yapısı

Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda çok az miktarlarda bulunurlar. Salisilik asit, hidroksibenzoik asit, gallik asit, prokateşik asit gibi asitler hidroksibenzoik asitler grubuna örnek olarak verilebilirler (Robbins, 2003).

2.3.2.2 Fenolik asitlerin farmakolojik etkileri

Klorojenik asit ve kafeik asitin *in vitro* olarak kanserojen ve mutajenik bazı azot reaksiyonlarını inhibe ettiği ve özellikle, klorojenik asitin de *in vitro* olarak DNA hasarını engelleyebildiği ispatlanmıştır (Plazonic ve ark., 2009). Rosmarinik asit, klorojenik asit ve sinarinin Cu(II) ve Fe(III) ile kompleks oluşturduğu; aynı zamanda prokateşik asitin Cu(II) ve Fe(II) ile ferulik asitin ise Fe(II) ile kompleks oluşturduğu ispatlanmıştır (Psotova, 2003).

Yapılan bir çalışmada enginarda bulunan en önemli fenolik asitin sinarin olduğu belirtilmiş, ayrıca bu sebzenin yapraklarında 1-3-orto-dikafeoil kinik asit, 1-4-orto-dikafeoil kinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit ve kriptomklorojenik asit bulunduğu belirtilmiştir. Sebze de bulunan sinarin molekülünün antihepatotoksik etkili, dispeptik hastalıkları bertaraf ettiği, ağrıları kestiği, baş dönmesini ve kaşıntıları azalttığı belirtilmiştir (Meriçli, 1989).

Fenolik asitlerin kanser ve koroner kalp hastalıkları gibi ölümcül hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdiklerinden dolayı son yıllarda çalışma sahası genişlemiştir. Ayrıca fenolik asitlerin anti-allerjik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik ve vasodilatör olmak üzere pek çok etkisi olduğu kanıtlanmış ve bu yararlı etkilerinin temel sebebinin antioksidan özellik göstermeleri olduğu rapor edilmiştir (Tuncel ve Yılmaz, 2010).

Yapılan bir çalışmada *Caucalis platycarpos* L. için HPLC-DAD ve elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometri yöntemleri ile flavonoid aglikonları, fenolik asitler ve flavonoid glikozitlerinin analizi için duyarlı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu bitkide kafeoil kinik asit izomerleri (CQA), p-kumaroilkinik asitler (p-CoQA), feruloil kinik asit (FQA), dikafeoil kinik asit (diCQA), luteolin-7-O-rutinosit, apigenin-7-O-rutinosit, luteolin, apigenin, krisoeriol ve krisoeriol-7-O-rutinosit bileşikleri tanımlanmıştır. Bu fenolik bileşikleri içeren bitkinin su ekstresinin antitümör aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Plazonic ve ark., 2009).

2.4. Doğal Boyarmaddeler

Boyarmaddeler, fiziksel veya kimyasal bir süreç sonucu başka bir madde ile reaksiyona girerek maddeyi renklendirme niteliğine sahip doğal veya sentetik

maddelerdir (Fessenden ve ark., 2001). Boyarmadde ile boya birbirinden farklı ifadelerdir. Boya; uygulandığı yüzeye tutunur ve mekanik yolla çıkabilir. Boyarmadde ise boyandığı materyal üzerine kimyasal bağlarla bağlanır ve mekanik yolla çıkmaz. Bir maddenin boya niteliğini alması için içerisinde kromofor denilen doymamış karakterdeki renk verici grupları bulundurması yeterlidir. Boyarmadde içerisinde ise; hem kromofor, hem de oksokrom adı verilen renk arttırıcı ve boyarmaddenin elyafa bağlanmasını sağlayan gruplar bulunmalıdır (Erdik ve ark, 2000).

Doğal boyarmaddeler, doğada bazı bitkiler, hayvanlar, likenler ve mantarlar tarafından sentezlenen maddelerdir ve tarih öncesi zamanlardan beri tekstil, seramik desenleri ve duvar resimleri gibi birçok alanda kullanılmışlardır (Cardon, 2007). Fakat, doğal kaynaklı boyarmaddelerin sağlanmasının mevsimlere bağlı oluşu, bitkisel kökenli birçok boyarmaddenin doğal boyalara bütünüyle eşdeğer olarak sentez edilebilmesi, sentetik boyarmaddelerin bitkilerde bulunabilen ve boyama işlemi üzerine olumsuz etkilerde bulunan yan maddeleri içermemesi, doğal boyalarla seri üretimde belli bir standartın tutturulmasının güçlükleri gibi etkenler sentetik boyarmaddelerin kullanımını hızla yaygınlaştırmıştır (Enez, 1987). Doğal boyaların dezavantajlı olduğu yönlerden diğerleriye üretimlerinin az olması ve aynı renk tonunun tekrarlanma zorluğudur (Tutak ve Benli, 2008). Bu sebeplerden dolayı özellikle 19. yüzyılın ortalarında sentetik boyarmaddelerin ard arda geliştirilmesi sonucunda doğal boyarmaddeler anlamlarını yitirmiştir. Fakat zamanla yapılan çalışmalar sentetik boyarmaddelerin çoğunun azo boyarmaddelerinden oluştuğunu göstermiştir. Azo boyarmaddeleri, belli koşullar altında redüktif yolla bozularak kanserojen etkili arilamin bileşiklerini meydana getirdiklerinden dolayı oldukça zararlı maddelerdir. Günümüzde ise doğal boyarmaddelerin kullanımı, sentetik boyar maddeler gibi sağlık açısından risk oluşturmadığı ve çevre kirliliğine sebep olmadığından dolayı tekrar gündeme gelmiştir. Sentetik boyarmaddelerden daha düşük renk hasıllı ve daha yüksek fiyatlı olmasına karşın doğal boyarmaddelerle boyanmış tekstil materyallerine Ülkemizdeki ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Doğal boyarmaddelerin büyük bir bölümü bitkilerden elde edilmektedir. Bitkisel boyarmaddeler, aromatik benzen halkası, karbonil, karboksil ve hidroksil grubu

içeren zayıf asit özelliğindeki maddelerdir ve mordanlı boyarmaddeler sınıfına girerler (Dölen, 1992).

Literatürde tarihi tekstil eserlerinde bulunan doğal boyarmaddelerin spektral ve kromatografik yöntemlerle analizine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmaların çoğunun amacı boyanmış örneklerin ne ile boyandığı ve hangi dönemde boyandığını açığa çıkarmaktır. Yapılan bir çalışmada müzelerden alınan tekstil örneklerinin boyarmadde analizleri HPLC-DAD yöntemiyle yapılmıştır. Sonuç olarak örneklerin lakkaik asit, kermesik asit, munjistin ve indigotin içerdiği saptanmıştır. Bu doğal boyarmaddelerin kanıtlanması sonucu toplanan örneklerin boyandığı dönemin tarihsel bilgiler ışığında 19. yy'ın sonu ve 20. yy'ın başı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Kareem ve ark., 2011).

İstanbul Topkapı müzesinden 15. ve 17. yy'a ait olduğu bilinen tarihi tekstil örnekleri alınmış ve boyarmadde analizleri yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre, 11 adet bitki ve böcek boyarmaddeleri HPLC-DAD yöntemi ile saptanmıştır (Yurdun ve ark., 2011).

Flavonoidlerin doğal boyarmadde olarak kullanımları çok eskilere dayanır. Mısır'da bulunan 4. ve 12. yüzyıldan kalma yün, ipek gibi arkeolojik tekstil ürünlerinde bulunan flavonoidler HPLC-DAD yöntemiyle saptanmıştır (Gawrys ve ark., 2003).

Yapılan bir çalışmada tarihi sanat eserinden alınan örneklerin boyarmadde analizleri HPLC–UV–Vis–ESI MS kullanılarak farklı polaritelerde 29 boyarmadde tanımlanmıştır. Bunlardan major olanlar karminik, kermesik, flavokermesik ve ellajik asit ile luteolin, apigenin, genistein ve indigotin olarak bulunmuştur (Lech ve Jarosz, 2011) .

Indigofera tinctoria L. ve aspir (*Carthamus tinctorius* L.) ile boyanmış yünlerin HPLC-DAD–MS ile boyarmadde analizleri yapılmıştır. Bunun için öncelikle bitkilerin dimetil sülfoksit (DMSO) ve dimetilformamid (DMF) ile ekstraksiyon koşulları sıcaklık ve zaman açısından incelenmiştir. Sonuç olarak bitkilerde indigotin, kartamin ve safflomin A maddeleri bulunmuş ve bu boyarmaddelerin kromatografik olarak uygun ekstraksiyon koşulları saptanmıştır (Mantzouris ve ark., 2014).

Deniz kabukluları ile yapılan bir çalışmada *Rapana venosa* türünde bulunan yedi adet indigo türevi boyarmaddenin bir arada ayrılması için HPLC-DAD ile ters fazlı bir yöntem geliştirilmiş ve 6,6-dibromoindirubin ve 6,6'-dibromoindigotin boyarmaddelerinin bulunduğu belirlenmiştir (Demirbağ ve ark., 2014).

Reseda luteola L. bitkisi ve *Dactylopius coccus* Costa böceği ile boyanmış tekstil materyallerinin boyarmaddeleri HPLC-DAD yöntemiyle incelenmiştir. Kromatogramların sonucuna göre bitkide minor flavonoid olan krisoeriol (3-O-luteolin metil eter), major flavonoid olarak luteolin, diosmetin ve apigenin bulunmuştur. HPLC-DAD, HPLC-MS and NMR teknikleri ile böcekte kermesik, flavokermesik ve karminik asit bulunmuş ve ayrıca flavokermesik asit-7-C-glikozit olduğu düşünülen bir yapı ve karminik asitin izomeri olduğu düşünülen bir yapı belirlenmiştir. Bu izomerinin karminik asitte bulunan şekerin farklı stereokimyasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Peggie ve ark., 2008).

Justicia spicigera Schldt Orta Amerika ve Meksika'da tarih öncesi dönemden beri mor renk kaynağı olarak kullanılmış bir bitki türüdür. Bu bitkinin UV-Vis ve Fourier transform infrared spektrofotometresi (FT-IR) ve piroliz-gaz kromatografi-kütle spektrometre (PY-GC/MS) teknikleri ile hem spektroskopik hem de kromatografik yöntemlerle kimyasal yapısı incelenmiştir. Sonuç olarak UV-Vis absorpsiyon spektrumunda maksimum dalga boyu 581 nm olan antosiyaninler ve polar yapıdaki hidroksi benzoik asitler bulunmuştur (Morales ve ark., 2012).

İndigo ve indigo türevi boyarmaddelerle ilgili bu zamana kadar yapılmış çalışmalar derlenmiş ve bir bibliyografi yayınlanmıştır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı indigo boyarmaddelerinin kimyası ve hazırlanışı ile ilgili bilgiler derlenerek verilmiştir (Cooksey, 2012).

Ters fazlı HPLC diod dizili dedektör (RP-HPLC-DAD) sistemi ile 4. yy'dan 12. yy'a kadar tarihlenen Varşova Ulusal Müzesi'nden toplanan örneklerin boyarmadde analizleri yapılmıştır. Boyarmadde ekstraksiyonları ılık piridin ve etanol içeren HCl çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu antrakinin türevi boyarmaddelerden alizarin, karminik asit ve purpurin, flavonoid boyarmaddelerinden ise luteolin, apigenin, ellajik asit, gallik asit, lakkaik asit A ile B ve indigotin bulunmuştur. Asidik ekstraksiyon metanol yerine etanol kullanılarak gerçekleştirilmiş bu sayede daha

yüksek kaynama noktasına sahip olan etanol ekstresinden daha fazla verimde boyarmadde ekstre edilebilmiştir (Gawrys ve ark., 2003).

Antik Mısır tekstil materyallerindeki boyarmaddeler HPLC sistemiyle fluoresans dedektörü kullanılarak kolon sonrası türevlendirmeyle analiz edilmiştir. Fluoresans sinyalinin gücünü arttırmak için alüminyum (Al^{3+}), galyum (Ga^{3+}), indiyum (In^{3+}) ve çinko (Zn^{2+}) kullanılmıştır. En yüksek fluoresans şiddeti Ga(III) ile elde edilmiştir. Sonuç olarak gallik asit, hematoksin, karminik asit, ellajik asit, kersetin, luteolin, kamferol, ramnetin, alizarin, munjistin ve purpurin boyarmaddeleri bu metotla tayin edilmiştir (Surowiec ve ark., 2003).

İskoçya'da bulunan müzeden 17. yüzyıla ait 81 adet örnek alınıp HPLC-DAD ile boyarmadde analizleri yapılmıştır. Örnekler DMF ile çözünüp, analiz sonucunda antrakinon türevi boyarmaddelerden alizarin, purpurin ve karminik asit; flavonoidlerden luteolin, apigenin, morin, kersetin, kamferol ve indigoidlerden ise indigotin boyarmaddeleri tanımlanmıştır (Surowiec ve ark., 2006).

Rubia tinctorium L., *Curcuma longa* L., *Alkanna tinctoria* ve *Matricaria chamomilla* türü bitkileri ile *Dactylopius coccus* Costa türü doğal boya böceklerinin ekstrelerinde bulunan fenolik bileşiklerden alizarin, kurkumin, karminik asit C18 kolonda HPLC ile tanımlanmış ve miktar tayinleri yapılmıştır (Bener ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada LC-DAD-MS ile *Reseda luteola* L. ile boyanmış halı örneği için en iyi ekstraksiyon çözücüsünün etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu/dimetilformamid (Na_2EDTA/DMF) (1:1, h/h) olduğu saptanmış ve bu koşulda 9 adet flavon türevi boyarmadde bulunmuştur. Örnekteki mordan analizleri ise indüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS) ile yapılmış ve mordan olarak alüminyum ve koyu tonların eldesi içinde demir metallerinin kullanıldığı saptanmıştır (Manhita ve ark., 2011).

2.4.1 Doğal boyarmaddelerin sınıflandırılması

Biyolojik kaynağına göre doğal boyarmaddeler bitkisel ve hayvansal kökenli doğal boyarmaddeler olarak sınıflandırılır. Hayvansal kökenli boyarmaddeler ise böcek boyarmaddeleri ve deniz kabuklularından elde edilen boyarmaddeler olmak üzere iki grupta incelenir. Doğal boyarmaddeler kimyasal yapısına göre kinonik

yapıdaki boyarmaddeler, indigoidler ve flavonoidler olarak sınıflandırılır. Doğal boyarmaddeler uygulama metotlarına göre ise; direkt, vat ve mordan boyarmaddeler olarak ayrılır (Rodriguez ve ark., 2010).

➤ Vat boyarmaddeler

Suda çözünmeyen, fakat indirgenlerin etkisiyle suda çözünebilen bileşiklere dönüşebilirler. Elyaf bu bileşiği kendine çeker ve oksijenin etkisiyle yükseltgenme meydana gelir ve böylece suda çözünmeyen pigmentler oluşur bu bileşiklere en iyi örnek *Isatis tinctoria* L.'den elde edilen indigoid türevi boyarmaddelerdir.

➤ Mordan boyarmaddeler

Doğal boyarmaddelerin tekstil liflerine ilgisi yok denecek kadar azdır. Boyama verimini artırmak için mordan olarak isimlendirilen metal tuzları ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ gibi) kullanılmaktadır (Zhang, 2001).

➤ Direkt boyarmaddeler

Direkt boyarmaddeler önceden bir işlem yapılmaksızın (mordanlama) boyarmadde çözeltisinden selüloz veya yüne direkt çekilirler. Elyafın iç misellerinde hiçbir kimyasal bağ meydana getirmeksizin depo edilirler. Renkli kısımda bazik grup içeren direkt boyarmaddeler sulu çözeltide zwitter iyon şeklinde bulunurlar (Başer ve İnancıcı, 1990).

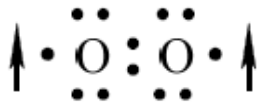
2.5. Antioksidanlar

2.5.1 Serbest radikaller

Oksijen molekülü hücrede enerji üretilmesinde çok büyük öneme sahiptir ve bu enerji üretimi sırasında vücutta bazı indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları oluşur. Bu reaksiyonların oluşumu esnasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece aktif olan ara ürünler meydana gelir. Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron çifti içeren atom ya da atom grubuna serbest radikal denir. Bu radikaller hücre solunumu ve normal metabolizma sırasında ağırlıklı olarak üretilen yüksek reaktif moleküllerdir (Kopan ve ark., 2006). Radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da yüksüz olabilirler. Metaller ve metal iyonlarının da ortaklanmamış elektronları bulunmalarına rağmen serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal

oluşumunda önemli rol oynarlar (Koppenol, 2000). Oksidanlar, radikal ve nonradikaller (radikal olmayan) olmak üzere iki grupta incelenir (Tablo 2.2). Hidrojen peroksit, hipoklorit ve azot monoksit radikal olmayan oksidanlarken, süperoksit, alkoksil, hidroksil, hiperoksi, peroksil radikalleri ise radikal oksidanlardandır (Baskin ve Salem, 1997).

Moleküler oksijen (O_2), eşleşmemiş elektron içeren paramanyetik özellikte ve bu eşleşmemiş iki elektronu dış orbitalde spinleri aynı yönde olan bir diradikal moleküldür.



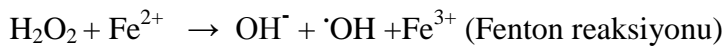
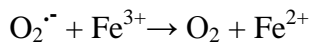
Moleküler O_2 (Baskin ve Salem, 1997)

Moleküler oksijen diradikal olduğundan dolayı reaktif oksijen türlerini meydana getirir. Tablo 2.2’de radikal ve radikal olmayan oksidanlar gösterilmiştir.

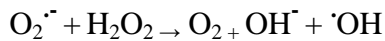
Tablo 2.2 Radikal ve radikal olmayan oksidanlardan bazılarının reaktiviteleri

Oksidan	İndirgenme potansiyeli (E^0 , V)
Radikaller (bir elektron)	
NO^{\cdot}/NO_3^-	-0,80
$O_2^{\cdot-}, 2H^+/H_2O_2$	0,94
$HO_2^{\cdot-}, H^+/H_2O_2$	1,06
$ROO^{\cdot}, H^+/ROOH$	1,00
NO_2^{\cdot}/NO_2^-	1,04
$RO^{\cdot}, H^+/ROH$	1,60
$CO_3^{\cdot-}, H^+/HCO_3^-$	1,78
$O_3^{\cdot-}, 2H^+/H_2O, O_2$	1,80
$HO^{\cdot}, H^+/H_2O$	2,31
Non-radikaller (iki elektron)	
$ONOOH, H^+/NO_2^-, H_2O$	1,40
$HOCl, H^+/Cl^-, H_2O$	1,28
$H_2O_2, 2H^+/2 H_2O$	1,77

Tablo 2.2 incelendiğinde süperoksit radikalının standart elektrot potansiyelinin orta yükseklikte bir değeri olduğu görülmektedir. Buna rağmen süperoksit radikali üzerinde çok fazla çalışma yapılan bir radikaldir. Bunun sebebi bu radikalın direkt değil indirekt verdiği zarardır. Bu radikalın asıl önemi hem hidrojen peroksit kaynağı olması hem de geçiş metallere iyonları varlığında yükseltgen olarak davranmasıdır. Yine tablodan görüleceği üzere hidroksil radikali en güçlü radikal oksidandır (2,31 V). Hidroksil radikali biyolojik sistemde üretildiğinde yağ asitlerinden proton kopararak karbon merkezli organik radikaller (RC[•]) ve organik peroksitler (ROO[•]) gibi yeni radikallerin oluşmasına sebep olan çok güçlü ve en aktif radikaldir. Hidrojen peroksit ise bir radikal olmayan oksidandır ve yüksek aktivasyon enerjisine sahip olduğundan düşük reaktiviteye sahiptir. Fakat hidrojen peroksit Fe²⁺ ve diğer geçiş metalleri ile Fenton reaksiyonu sonucu çok zararlı bir radikal olan hidroksil radikalını oluşturur (Augusto ve Miyamoto, 2011; Yerer ve Aydoğan, 2000). Ayrıca hidrojen peroksit süperoksit radikali ile de Haber-Weiss reaksiyonu sonucu zararlı hidroksil radikalını meydana getirir (Kohen ve Nyska, 2002). Haber-Weiss reaksiyonunun demirle katalizlenmesiyle de önce ferri (Fe³⁺) süperoksit ile reaksiyona girerek ferro (Fe²⁺)'ya indirgenir, sonra fenton reaksiyonu ile H₂O₂'den [•]OH ve ⁻OH oluşur; reaksiyon mekanizması şu şekildedir (Barbusinski, 2009).



Haber-Weiss reaksiyonu:



Tablo 2.2'de görülen tüm radikallere reaktif oksijen türleri (ROT) denmektedir. Önceki yıllarda kullanılan serbest oksijen radikalleri terimi yerini ROT terimine bırakmıştır. Çünkü Tablo 2.2'den de görüleceği üzere yalnızca radikal değil, radikal olmayan fakat organizma için potansiyel tehlike unsuru olan oksijen türevleri de bulunmaktadır (Halliwell, 2001). Bu kararsız ve aktif olan ROT'lar hücre içerisinde farklı organik substratlarla reaksiyona girme eğilimindedirler. Hücresel savunma mekanizmaları ise bu reaksiyonları engelleme ya da ortadan kaldırma eğilimindedir.

Fakat bazen fazla miktarda oksijen konsantrasyonuna maruz kalma, antioksidan etkili bileşiklerin yeteri miktarda vücuda alınamamaları gibi sebeplerle savunma mekanizmasının da ortadan kaldıramayacağı miktarda reaktif oksijen türleri oluşur ki bu durum oksidatif stresi ortaya çıkarır. Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan arasındaki dengenin oksidan yönüne kayarak fazla oksidanların hücre hasarına yol açmasıdır (Halliwell, 2012).

Biyolojik sisteme zarar veren ROT'ların dışında reaktif azot türleri de (RAT) bulunmaktadır ve bu türlerin en önemlisi azot monoksittir. Azot monoksit (NO), endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, hepatositler, nöron ve pek çok başka hücreler tarafından sentezlenebilen serbet bir radikaldir (Singh ve ark., 2009). NO biyolojik sisteme direkt ve indirekt olarak şu şekilde zarar vermektedir; direkt olarak demir içeren proteinlerden demiri çıkararak kendisi bağlanır, indirekt olarak verdiği zararda ise NO'nun süperoksit ya da oksijenle reaksiyona girip başta peroksinitrit (ONOOH) olmak üzere zararlı reaktif ürünler oluşturmasıdır. Peroksinitrit, nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) oluşturmak üzere metabolize edilir ve ayrıca azot dioksit (NO₂[•]), hidroksil radikali (OH[•]), nitronyum iyonu (NO₂⁺) gibi toksik ürünlere dönüşebilir (Özmen, 2010).

ROT'ların neden olduğu hücre hasarı sonucu birçok hastalık tespit edilmiştir. Bu serbest radikallerin yaşlanmaya sebep olduğu, ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, akciğer hastalıkları (astım, kronik bronşit), eklem rahatsızlıkları (romatizma, kireçlenme), böbrek hastalıkları, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2003; Pham-Huy ve ark., 2008).

2.5.2 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlardan daha düşük derişime sahip olsalar dahi substratın prooksidanlar (reaktif oksijen, azot ve serbest radikaller) ile başlatılan oksidasyon reaksiyonunu engelleyen ve böylelikle de prooksidanların sebep olduğu hastalıkları önleyen yararlı bileşiklerdir (Halliwell, 2012).

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere sınıflandırılırlar.

2.5.2.1 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

Tablo 2.3'te enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar gösterilmiştir. En önemli enzimatik antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) enzimidir. SOD, süperoksit anyon radikalinin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler. Diğer önemli enzimatik antioksidanlardan katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri ise açığa çıkan hidrojen peroksite moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlayarak hidrojen peroksite sebep olduğu hidroksil radikalinin zararlı etkisini ortadan kaldırırlar (Helle ve ark., 1997).

Flavonoidler ve fenolik asitler gibi polifenoller, tiamin, riboflavin, α - tokoferol, askorbik asit gibi vitaminler, salisilik asit, sülfidril grupları, karotenoid türevleri, glukoz oksidaz, katalaz, peroksidaz gibi enzimler, organik asitler (glukonik, sitrik, malik asit), Maillard reaksiyonu ürünleri, aminoasitler ve proteinler doğal antioksidanlardır (Karadal ve Yıldırım, 2012).

BHA (bütillenmiş hidrokşianisol), BHT (bütillenmiş hidroksi toluen) ve TBHQ (*t*-bütillhidrokinon) gibi sentetik antioksidanlar gıdaların bozunmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadırlar. Bazı araştırmacılar tarafından yapılan hayvan deneylerinde bu sentetik antioksidanların toksik etkisinin olduğu tespit edildiğinden dolayı gıda sanayisinde kullanılmaması gerektiği vurgulanmıştır. Bu sebeple günümüzde doğal antioksidan kaynaklı materyaller üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmaktadır (Tepe ve ark., 2007).

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar vücutta çeşitli hastalıklara sebep olan reaktif oksijen türlerini nötralize etmektedirler. Örneğin hidroksil radikali vitamin C, glutatyon, flavonoidler ve lipoik asit tarafından; süperoksit radikali, vitamin C, glutatyon, flavonoidler ve süperoksit dismutaz tarafından, hidrojen peroksite radikali vitamin C, glutatyon, flavonoidler, beta karoten, vitamin E, koenzim Q10 ve lipoik asit tarafından; lipid peroksite radikalleri ise glutatyon peroksidaz, flavonoidler, beta karoten, vitamin E ve ubikinon (koenzim Q) antioksidanları tarafından nötralize edilirler (Percival, 1998).

Tablo 2.3 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar (Rice-Evans ve ark., 1997)

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Doğal	Sentetik
Süperoksit dismutaz (SOD)	Vitamin C	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
Selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz (GPx)	α -tokoferol	Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT)
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Polifenolik bileşikler	Gallik asit türevleri Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ)
Katalaz	Karotenoidler	Nordihidroguareyetik asit (NDGA)
Glutasyon redüktaz (GR)		

2.5.2.2 Reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar

Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlamasını engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır (Niki, 1997). Birincil antioksidanlar, serbest radikaller ile doğrudan reaksiyona girerek bir elektron ya da bir hidrojen atomunu verirler. Bu antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda dahi oldukça etkilidirler. Sentetik olan birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksi toluen, *t*-bütıl hidrokinon ve doğal olan birincil antioksidanlara ise tokoferoller, karotenoidler, vitamin C ve vanilin verilebilir (Charles DJ, 2013).

İkincil (tip-2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar serbest radikalleri kararlı ürünlere dönüştürmez fakat oksidasyon hızını yavaşlatırlar. İkincil antioksidanlar prooksidan metallere kelat yaparak onları deaktif hale getirirler. İkincil antioksidanlar, oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kırarlar. İkincil antioksidanlara örnek olarak sitrik asit, askorbik asit, lesitin, tartarik asit, EDTA ve β -karoten verilebilir (Koca ve Karadeniz 2003).

2.5.3 Antioksidan kapasite tayin yöntemleri

Reaksiyon mekanizmalarına göre antioksidan kapasite tayinleri başlıca iki gruba ayrılabilir:

1. Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)
2. Tek elektron transferlerine dayanan reaksiyonlar (SET)

Üçüncü bir grup hem HAT hem de SET reaksiyon mekanizmalarını içerir (Huang ve ark., 2005).

➤ Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)

HAT mekanizmasına dayanan tayinlerin çoğu yarışmalı reaksiyon kinetiğini izler ve kantitasyon kinetik eğrilerinden yapılır. HAT'a dayanan metotlar genellikle sentetik bir radikal üreticiden, yükseltgenbilir moleküler probdan ve bir antioksidan bileşikten oluşur. ORAC (oksijen radikal absorpsiyon kapasite yöntemi), TRAP (toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi) gibi HAT-temelli metotlarda peroksil radikali (ROO[•]) üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidan radikaller için ortamdaki substrat ile yarışır. ROO[•] tercihen antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuçta ROO[•] ve hedef molekül arasındaki reaksiyon inhibe edilir veya geciktirilir (Büyüktuncel, 2013).

➤ Elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET)

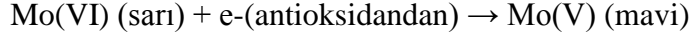
ET-dayanan metotlar reaksiyonun eşdeğer noktasında bir indikatör görevi gibi davranan oksidanın antioksidanla verdiği redoks reaksiyonu üzerine temellenir. Oksidanın indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının renkleri farklıdır. (Huang ve ark., 2005). Renk değişiminin derecesi, antioksidan derişimiyle orantılıdır:

Oksidan + e⁻(antioksidan) → indirgenmiş oksidan + yükseltgenmiş antioksidan

Folin-Ciocalteu yöntemi (FC), troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC), demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan yöntemi (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi, Cu(II)'nin oksidan olarak kullanıldığı toplam antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC) gibi yöntemler ET temelli antioksidan kapasite yöntemleridir (Ndhlala ve ark., 2010).

2.5.3.1 Folin Ciocalteu fenol reaktifiyle toplam fenolik miktar tayini yöntemi

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir ($3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 13\text{WO}_3\cdot 5\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Varsayılan aktif merkezi Mo(VI)'dır.

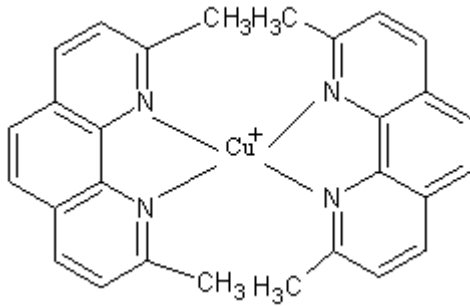


Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler (Sodyum karbonat çözeltisiyle pH 10'a ayarlanır). Fenolik bir protonun ayrılması, FCR'yi indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonun oluşmasına neden olur. Mavi renkli kompleks oluşumu 765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. (Apak ve ark., 2013; Büyüktuncel, 2013).

Antioksidan + Bazik çözelti (pH=10) + Folin-Ciocalteu reaktifi = Mavi renkli ürün

2.5.3.2 CUPRAC bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi

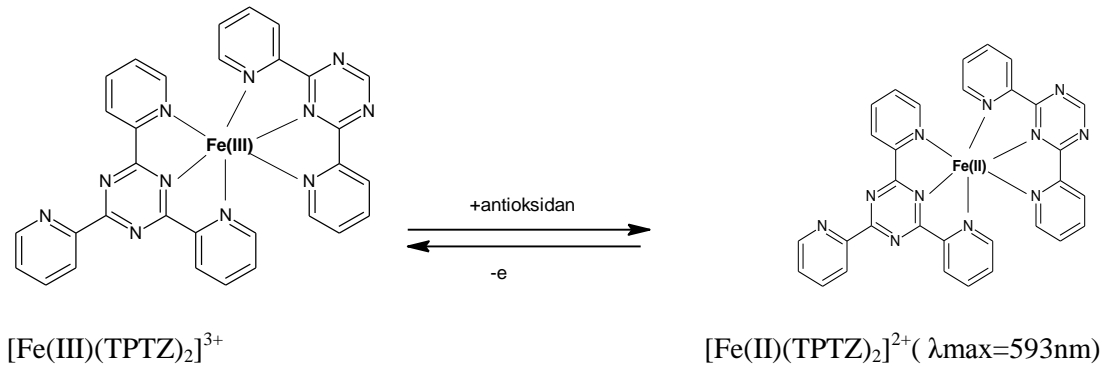
Bu yöntemde 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin veya Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin [Cu(II)-Nc], 450 nm'de maksimum absorban veren bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır. Cuprac yöntemi hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilmektedir (Apak ve ark., 2004).



Şekil 2.10 Cu(I)-Nc kelatının kimyasal yapısı (Özyürek ve ark., 2011)

2.5.3.3 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)

FRAP yönteminin avantajı elektron-transfer reaksiyonu olmasıdır. Burada Fe(III) tuzu, $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ (TPTZ=2,4,6-tripiridil s-triazin), oksidan olarak kullanılır. Düşük pH da, Fe(III)-TPTZ kompleksi, Fe(II) formuna indirgenir (Şekil 2.11). Bu kompleks koyu mavi renklidir ve absorpsiyon maksimumu 593 nm'dir (Benzie ve Strain, 1996).



Şekil 2.11 Fe(III) kompleksinin Fe(II) formuna indirgenmesi

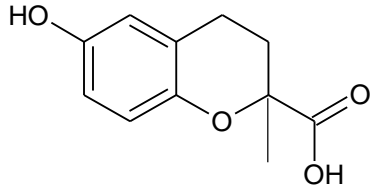
Fe(III) tuzunun redoks potansiyeli (0,70 V) ABTS'nin redoks potansiyeli (0,68 V) ile benzerdir. Bu yüzden, TEAC ve FRAP yöntemleri arasında pek fark yoktur. TEAC yöntemi, nötral pH'da, FRAP yöntemi ise demirin çözünürlüğünü sağlamak için asidik koşullarda (pH 3,6) gerçekleştirilir.

FRAP yöntemi basit, ucuz ve dayanıklı bir yöntemdir. Ayrıca FRAP yöntemi hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini için uygun bir yöntemdir. Bu yöntem orijinal olarak plazmanın antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilse de bitki ekstraktlarının aktivitelerini ölçmek için de kullanılır (Szollosi ve Varga, 2002). Yöntemin dezavantajlarından biri glutasyon gibi tiyol içeren antioksidanların ölçülememesidir. Bunun nedeni Fe(III)'ün kimyasal olarak inert olmasına sebep olan yüksek spinli yarı dolu d orbitalleri olabilir. Ayrıca diğer bir neden FRAP yöntemi ile fizyolojik olmayan pH'da çalışılmasıdır. Diğer bir dezavantajı ise reaksiyonunun spesifik olmamasıdır: redoks potansiyeli 0,70 V'dan daha düşük potansiyele sahip, *in vivo* olarak antioksidan özellik göstermeyen herhangi bir bileşik bile demiri indirgeyebilir (Büyüktuncel, 2013).

2.5.3.4 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)

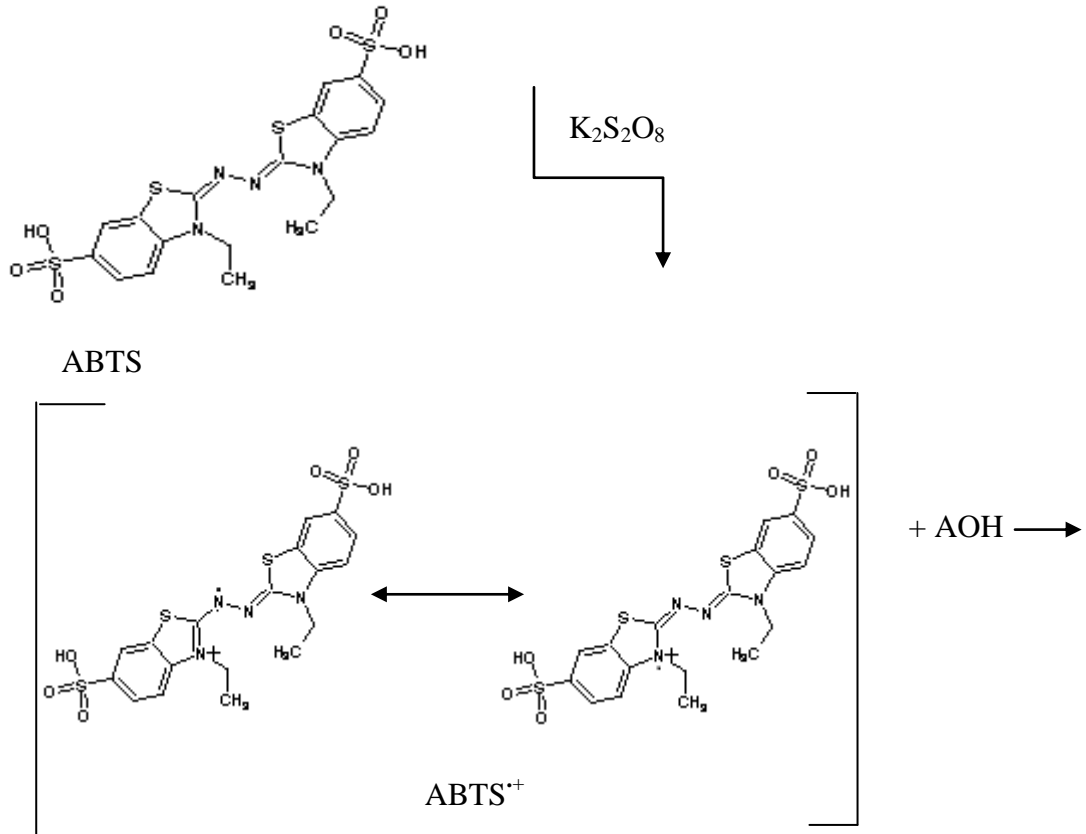
Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC) ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Miller ve ark., 1993). Troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit] (Şekil 2.12), E vitamininin suda çözünür eşdeğeri (Re ve ark., 1999). Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan kapasite tayin yönteminde standart madde olarak kullanılır. Genellikle belli bir konsantrasyon aralığında troloks

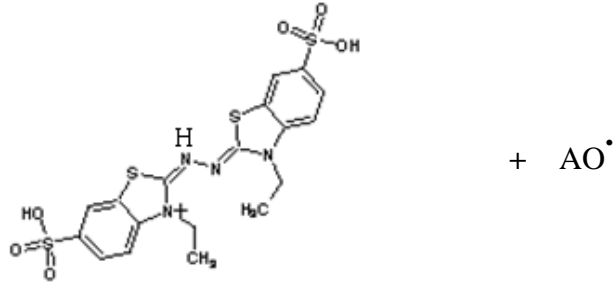
antioksidan olarak kullanılarak bir çalışma grafiği hazırlanır ve bilinmeyen antioksidanın kapasitesi bu grafikten troloks eşdeğeri olarak değerlendirilir.



Şekil 2.12 Troloks molekülünün kimyasal yapısı

Kromojenik bir redoks radikali olan ABTS [2,2-azinobis (3- etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)] aynı zamanda kararlı bir radikaldir. Hem suda hem organik çözücülerde çözüldüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan kapasite tayininde kullanılabilir (Büyüktünel, 2013). Antioksidanlar varlığında $ABTS^{+}$ radikal kationunun absorbanısında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden bulunur. Bu nedenle bu yöntem “troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi” (ABTS/TEAC) adı da verilir.





Şekil 2.13 ABTS^{•+} katyon radikalinin antioksidan maddelerle verdiği reaksiyon (Oliveira ve ark., 2014).

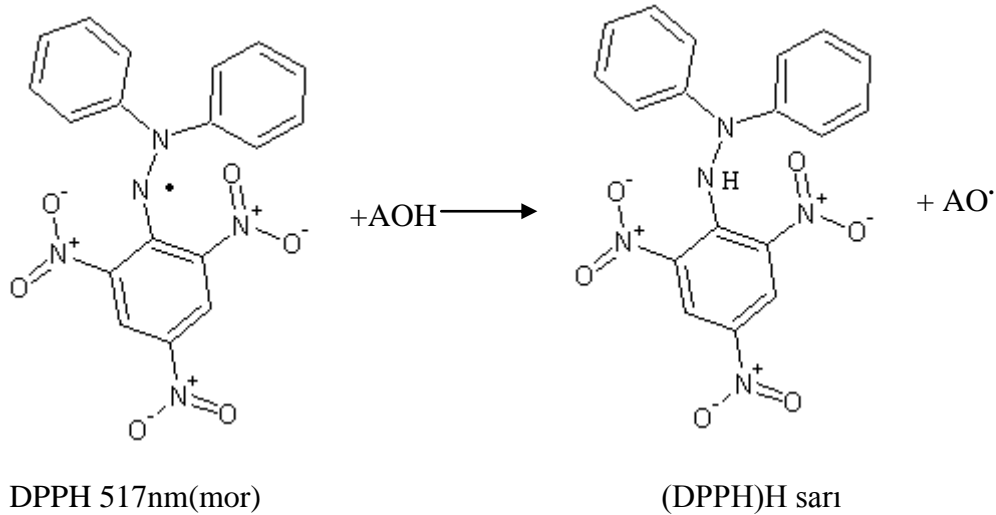
Orjinal yöntemde ABTS radikal katyonu, H₂O₂ ile metilmiyoglobinin reaksiyona girmesiyle oluşan ferrilmiyoglobin ile ABTS arasındaki etkileşimden oluşmaktadır. ABTS^{•+} radikal katyonunun karakteristik absorpsiyon spektrumu 660, 734, 820 nm’de maksimum vermektedir (Rice-Evans ve Miller, 1984; Pellegrini ve ark.,1999). Orjinal TEAC yönteminde analiz edilen maddenin (antioksidanın) ABTS radikalini indirgeme yeteneği ölçülmektedir. Ancak bu madde ferrilmiyoglobini de indirgeyebilir. Modifiye edilen TEAC yönteminde (Re ve ark., 1999), ABTS’nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu ABTS^{•+} radikal katyonu oluşmaktadır (Şekil 2.13). Yani sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal katyonu oluşturulmaktadır. Orjinal metotta ise antioksidan varlığında radikal meydana gelmektedir (Van den Berg ve ark., 1999). Oluşan radikal katyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda iki gün dayanıklıdır. Geliştirilen metodun orijinal metottan farkı hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmesi ve bir dekolorizasyon (renk giderimi) yöntemi olmasıdır. ABTS radikali fizyolojik bir radikal olmadığından *in vivo* deneylerde doğru bir etki göstermez. Ancak TEAC deneyi klinik çalışmalarda uygunluk gösterir (Wang ve ark., 2004).

2.5.3.5 DPPH radikali giderme aktivitesinin tayini

Bu metot 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalinin antioksidanlar tarafından süpürülmesi esasına dayanmaktadır. DPPH radikalinde bulunan azot atomu antioksidan maddenin hidrojeni ile reaksiyona girerek elektronunu çiftleştirir (Şekil 2.14). Böylece DPPH radikalinin 517 nm’deki molar absorpsiyon katsayısı 9660’tan 1640’a düşer ve sonuç olarak radikal indirgendiğinden mor olan rengi sarıya dönüşür. DPPH radikalinin verdiği sinyal antioksidanın konsantrasyonu ve

reaksiyon zamanı ile ilişkilidir. Metanol veya etanolde çözülmüş DPPH radikaline antioksidan ilave edildikten sonra absorbansdaki azalma 515-528 nm aralığında ölçülür. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. DPPH yöntemi flavonoidlerin, kumarinlerin, antosiyaninlerin ve diğer fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılır (Azeez ve Adaramoye, 2014; Giridhari ve Manasi, 2011).

DPPH'in % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan ekstre ve standart madde konsantrasyonu IC_{50} olarak tanımlanır. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin y eksenine yerleştirilmesi ile elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır ve sonuçlar $IC_{50} = \text{mg/mL}$ olarak verilir. DPPH radikali ile antioksidan arasında gerçekleşen reaksiyon Şekil 2.14'de gösterilmiştir (Son ve Lewis, 2002).



Şekil 2.14 Antioksidanların DPPH ile radikal süpürme reaksiyonları

DPPH, organik çözücülerde özellikle etil alkolde çözünebilen bir radikaldir. Bu durum ABTS ile karşılaştırıldığında hidrofilik antioksidanların antioksidan aktivite ölçümlerinde sınırlamalar getirmektedir (Wojdylo ve ark., 2007). Aynı zamanda bu yöntem plazma antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde uygun değildir. Çünkü plazma proteinleri metanol veya etanol varlığında çökelti oluştururlar (Kedare ve Singh, 2011).

2.5.3.6 Metal kelatı oluşturma kapasitesinin tayini

Metal kelatı oluşturma kapasitesi yöntemi, Fe^{2+} iyonlarını bağlamak üzere güçlü bir demir kelatlayıcı olan ferrozin reaktifini ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Kelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe^{2+} /ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir. Bu yöntemde belli konsantrasyonlarda hazırlanan ekstre veya standart EDTA zeltisine Fe^{2+} zeltisi eklenir. Daha sonra bu karışıma ferrozin eklenir ve referansa karşı çözeltilerin absorbansları 562 nm'de UV spektrofotometrede okunur (Dinis ve ark., 1984).

Ferrozin – Fe^{2+} kompleksi oluşumunu engelleme yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\% \text{ Kelatlama Aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100]$$

A_0 : Kontrol reaksiyonunun absorbansı,

A_1 : Bitki ekstreleri ve standart çözeltilerin absorbansı

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyaller

Achillea grandifolia bitkisi Mayıs 2011 tarihinde Kocaeli ilinin Kartepe ilçesinden yaklaşık 1520-1625 metreden toplanmış ve teşhisi Prof. Dr. Ertan Tuzlacı tarafından gerçekleştirilmiştir. Bitki örneği Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda MARE 14583 kodu ile saklanmaktadır.

3.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler

Ramnetin, klorojenik asit, kafeik asit, trifloroasetik asit (TFA), neokuproin, kateşin, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit, ferrozin [3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonik asit sodyum tuzu], Folin Ciocalteu reaktifi (FCR), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit] ve α -tokoferol (Toc), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_2 , Na_2EDTA , gallik asit, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Sigma'dan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya), askorbik asit, kloroform, diklorometan, etil asetat, etil alkol, sodyum karbonat, amonyak, asetonitril (CH_3CN) ve hidroklorik asit Merck KGaA'dan (Darmstadt, Germany) satın alınmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktadır.

3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması

3.2.2.1 Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan çözeltiler

Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR-fosfotungstik-fosfomolibdik asit + CuSO_4) ticari şekli ile kullanıldı.

% 2'lik Sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisinin hazırlanması: 2,0 g Na_2CO_3 tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve distile su ile hacmine tamamlandı.

3.2.2.2 Toplam flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 10'luk alüminyum klorür çözeltisinin hazırlanması: 5,0 g AlCl_3 50 mL'lik balon jøjeye konuldu ve bir miktar distile su ile çözüldükten sonra yine distile su ile hacmine tamamlandı.

% 5'lik Sodyum nitrit çözeltisinin hazırlanması: 2,5 g NaNO_2 50 mL'lik balon jøjeye konuldu ve bir miktar distile su ile çözüldükten sonra yine distile su ile hacmine tamamlandı.

1,0 M NaOH çözeltisinin hazırlanması: 2,0 g NaOH 50 mL'lik balon jøjeye konuldu ve bir miktar distile su ile çözüldükten sonra yine distile su ile hacmine tamamlandı.

3.2.2.3 DPPH serbest radikali giderme kapasitesinde kullanılan çözelti

$6,0 \cdot 10^{-5}$ M DPPH çözeltisinin hazırlanması: 2,4 mg DPPH tartıldı ve 100 mL etil alkolde çözüldü.

3.2.2.4 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler (TEAC)

7,0 mM ABTS⁺⁺ stok çözeltisinin hazırlanması: 0,3841 g 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu tartıldı bir miktar distile suda çözüldü ve yine distile suyla 100 mL'lik balon jøjede hacmine tamamlandı.

2,45 mM potasyum peroksodisülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) çözeltisinin hazırlanması: 0,0662 g potasyum peroksodisülfat tartıldı, distile suda çözüldü ve 100 mL'lik balon jøjeye hacmine distile su ile tamamlandı.

75 mM fosfat tamponu (pH 7,4) hazırlanması: 1,0207 g KH_2PO_4 ve 4,2588 g Na_2HPO_4 300 mL distile suda çözüldü. pH'ı 1,0 N HCl ve 1,0 N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3.2.2.5 Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler (FRAP)

40 mM HCl çözeltisinin hazırlanması: 820 μL der. HCl (% 37'lik) 250 mL'lik balon jøjede distile su ile hacmine tamamlandı.

10 mM TPTZ çözeltisinin hazırlanması: 0,0312 g TPTZ, 10 mL 40 mM HCl'de 50 °C 'deki su banyosunda çözüldü.

20 mM FeCl₃.6H₂O çözeltisinin hazırlanması: 0,5406 g FeCl₃.6H₂O tartıldı, bir miktar suda çözüldü ve 100 mL'lik balon jodede hacmine tamamlandı.

300 mM asetat tamponu (pH 3,6) çözeltisinin hazırlanması: 3,1 g NaCH₃COO.3H₂O tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldü, üzerine 16 mL glasiyel asetik asit eklenip 1L'lik balon jodede yine distile suyla hacmine tamamlandı.

3.2.2.6 Metal kelatı oluşturma kapasitesi yönteminde kullanılan çözeltiler

5,0.10⁻³ M ferrozin çözeltisinin hazırlanması: 0,0616 g ferrozin tartıldı, bir miktar distile suda çözüldü ve 25 mL'lik balon jodede distile su ile hacmine tamamlandı.

2,0.10⁻³ M FeCl₂ çözeltisinin hazırlanması: 0,0254 g FeCl₂ tartıldı, distile suda çözüldü ve 100 mL'lik balon jodede hacmine tamamlandı.

3.2.2.7 Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yönteminde kullanılan çözeltiler (CUPRAC)

7,5.10⁻³ M neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisinin hazırlanması: 0,0780 g neokuproin tartıldı, bir miktar etanolde çözümlenip 50 mL'lik balon jodede yine etanol ile hacmine tamamlandı.

1,0 M amonyum asetat (NH₄Ac) çözeltisinin hazırlanması: 3,85 g NH₄Ac tartıldı, bir miktar distile suda çözümlenip 50 mL'lik balon jodede distile suyla hacmine tamamlandı.

1,0.10⁻² M bakır(II) sülfat pentahidrat (CuSO₄.5H₂O) çözeltisinin hazırlanması: 0,1248 g CuSO₄.5H₂O tartıldı, bir miktar distile suda çözümlenip 50 mL'lik balon jodede distile suyla hacmine tamamlandı.

3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

HPLC (Schimadzu LC-20AT)

LC- QTOF/MS (Agilent technologies 6530)

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı (Dionex ASE 100)

Ultraviyole-görünür bölge spektrofometresi (UV-Vis), (Shimadzu UVmini-1240)

Evaporatör (Rota Evaporatör- Heidolph VV 2000)

Çalkalamalı su banyosu (Memmert WB 14 termostatlı)

Otomatik pipetler (20-200 µL, 100-1000 µL) (pipet4U ve Witeg, Almanya)

Hassas terazi (Denver)

Manyetik karıştırıcı ısıtıcı (WiseStir MSH-20A, Kore)

pH-metre (Jenco-6179)

Vorteks (Bio vortexV1)

Ultra saf su cihazı (Millipore Milli-Q RG)

3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

3.4.1 HPLC çalışma koşulları

Schimadzu HPLC sistemi (LC-20 AT)

Waters Nova-Pak C18 kolon, 4 µm (3,9 x 150 mm) 30 °C'de korundu.

Mobil faz: A fazı H₂O - % 0,1 TFA; B fazı CH₃CN - % 0,1 TFA

Toplam akış hızı: 0,5 mL/dk

Enjeksiyon miktarı: 20 µL

HPLC'de ayırım için kullanılan gradient elüsyon profili Tablo 3.1'de görülmektedir.

Tablo 3.1 HPLC'de kullanılan gradient elüsyon profili (Halpine, 1996).

Zaman(dk)	Akış hızı (mL/dk)	H ₂ O-%0,1TFA	CH ₃ CN-%0,1TFA
0,0	0,5	95	5
1,0	0,5	95	5
20	0,5	70	30
25	0,5	40	60
28	0,5	40	60
33	0,5	5	95
35	0,5	5	95
40	0,5	95	5

3.5 Sıvı Kromatografi Kuadropol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Q-TOF LC/MS)

Kütle spektrometrisi çok az miktarda (pikogram düzeyinde) madde kullanılarak yapı analizinin yapılabildiği bir yöntemdir. Bununla beraber kütle spektrometresi sıvı ya da gaz kromatografına bağlanarak yalnız saf maddelerin değil karışımların da analizine olanak sağlar. Kütle spektrometresi, molekülün buharlaştırılması, iyonlaştırılması ve oluşan iyonların kütle/yük (m/z) değerlerine göre ayrılarak kaydedilmesi için geliştirilmiş bir yöntemdir (Erdik, 1993). Spektrometrede oluşturulan iyonların çoğu tek yüklü olduğu için m/z oranı iyonun kütlesine eşittir. Örnek ilk önce iyon kaynağında iyonlaştırılır. İyon kaynağının çıktısı kütle analizörüne gitmek üzere hızlandırılan negatif iyon akımıdır. Kütle analizörünün görevi gelen iyon akımını analit iyonlarının m/z oranına göre ayırtmaktır (Skoog, 1998). Kuadropol kütle analizörü elektrot olarak çalışan dört paralel silindirik çubuktan oluşur.

3.5.1 Q-TOF LC/MS çalışma şartları

Sıvı kromatografi kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi Q-TOF-LC/MS sisteminde (Agilent 6530, CA, Amerika) elektropray iyonlaştırıcı (ESI) kaynağı (G6530B modeli, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) kullanılmıştır. Gradient programı HPLC-DAD sisteminde kullanılan elüsyon metoduyla aynıdır. Analiz için negatif iyon modları kullanıldı ve kütle aralığı ise 100-1000 m/z 'ye kadar çalışıldı. ESI-Q-TOF-LC/MS'te çalışma parametreleri şu şekilde optimize edildi: kapiler voltajı 3500V, kurutucu gaz sıcaklığı 350 °C, kurutucu gaz akış hızı 8 L/dk, sprey gaz basıncı 2 bar ve son plak dengeleme -500 V'dur.

3.6. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE) Çalışma Koşulları

0,5 g bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımları tartıldı ve üzerine 0,5 g diatom toprak eklenerek karıştırılarak filtre kağıdına sarıldı, ekstraksiyon hücreesine yerleştirildi. Tablo 3.2'deki koşullarda ekstraksiyonlar gerçekleştirildi.

Tablo 3.2 Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) çalışma koşulları

Sıcaklık	40 °C
Statik zaman	5 dk
Temizleme hacmi	% 60
Yıkama zamanı	100 s
Statik devir	3

3.7. *A. grandifolia* Bitkisinin İçerdiği Boyarmaddelerin Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi

Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının içerdiği boyarmaddelerin ekstraksiyonu için en uygun sıcaklık ve süreyi saptayabilmek amacıyla bitkinin her bir kısmından mL'sinde 0,25 mg bitki içeren çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler, 100 °C'deki su banyosunda 5, 10, 15, 30, 45 ve 60 dk arasında bekletildi. Süresi biten ekstreler musluk altında soğutulup, süzgeç kağıdından süzülerek UV-görünür bölge spektrofotometresinde 200-500 nm aralığında spektrumları alındı. Ekstraksiyon için yeterli sürenin 30 dk olduğu anlaşıldı ve daha sonra en uygun sıcaklık koşulunu belirlemek için 50 °C, 75 °C ve 100 °C'deki su banyolarında aynı konsantrasyondaki bitkinin farklı kısımları 30 dk ekstrakte edildi. Ekstreler soğutulduktan sonra süzgeç kağıdından süzülüp 200-500 nm aralığında spektrumları alındı.

3.8. Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Ekstrelerin Hazırlanması

Achillea grandifolia bitkisinin toprak üstü kısımları gölgede kurutulduktan sonra çiçek, yaprak ve gövde kısımlarına ayrıldı ve öğütücü ile toz haline getirildi. Bitkinin yaprak kısmından 36,1921 g, çiçek kısmından 36,2692 g, gövde kısmından ise 35,0429 g tartıldı. Bitkinin bu kısımları oda sıcaklığında üçer hafta boyunca arada sırada karıştırılarak masere edildi. Daha sonra elde edilen ekstrelerin çözücüleri evaporatörde 40-50 °C'de düşük basınç altında uçuruldu. Elde edilen ekstrelerin miktarı ve verimi Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3 *A. grandifolia* bitkisinden elde edilen ekstrelerin miktarları (g) ve % verimleri

Bitki kısımları	Ekstrelerin miktarları (g)	Ekstrelerin verimleri (%)
Çiçek	3,2548	8,97
Yaprak	1,9579	5,41
Gövde	0,9117	2,6

3.9. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Miktarlarının Belirlenmesi

3.9.1 Toplam fenolik madde miktarı tayini

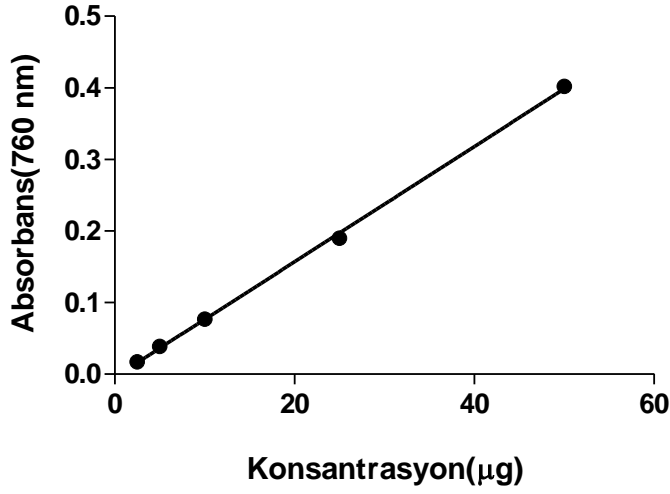
Ekstrelerdeki toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu ayıracı (FCR) kullanılarak tayin edildi (Öztürk, 2008).

50-200 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden 1 mL alınarak üzerine 45 mL distile su eklendi. Bu karışıma 1 mL FCR ve 3 dk sonra 3 mL % 2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden ilave edildi. Karışım ara sıra karıştırılarak oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra meydana gelen mavi rengin absorbansı referansa karşı 760 nm'de ölçüldü. Deney üç kez tekrarlanarak absorbansların ortalaması alındı.

Kateşinin Folin-Ciocalteu yöntemiyle hazırlanan kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Kateşinin standart doğru denkleminin elde edilebilmesi için önce kateşinin 100 µg/mL'lik stok çözeltisi etanol ile hazırlandı. Bu çözeltinin etanol ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 2,5, 5,0, 10, 25 ve 50 µg/mL olan standart çözeltiler elde edildi. Hazırlanan çözeltilerin toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu ayıracı kullanılarak tayin edildi. Çözeltilerin absorbansları 760 nm'de referansa karşı ölçüldü. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları standart kateşin grafiğinden elde edilen doğru denklemi kullanılarak µg kateşin eşdeğeri şeklinde belirlendi (Şekil 3.1).

$$\text{Absorbans} = 0,0081 \text{ kateşin } (\mu\text{g}) - 0,0042 \quad (R^2: 0,9993)$$



Şekil 3.1 Kateşinin Folin-Ciocalteu yöntemiyle hazırlanan kalibrasyon eğrisi

3.9.2 Toplam flavonoid miktar tayini

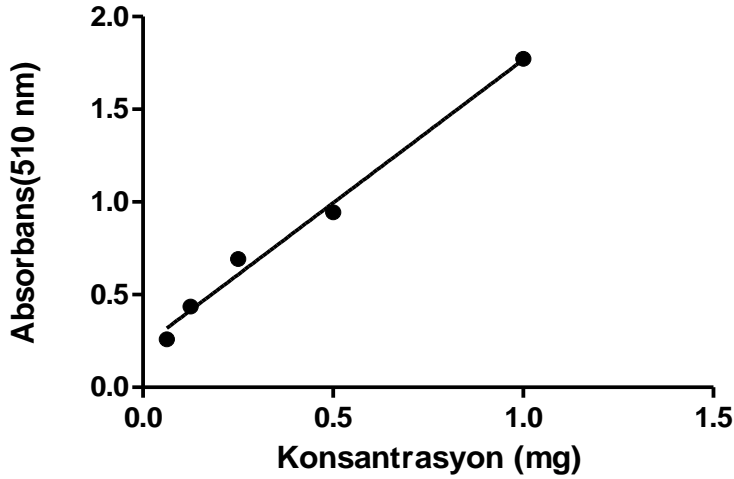
Bitki ekstralarının toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum klorür renk ölçüm yöntemiyle belirlendi. Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından 2,0 1,0 ve 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan etanol ekstralarının herbirinden 0,5 mL alınarak 2 mL distile su ile karıştırıldı. Daha sonra karışımın üzerine % 5,0 (a/h)'lık NaNO_2 çözeltisinden 0,15 mL eklendi ve bu karışım 6 dk bekletildi. Ardından karışımın üzerine 0,15 mL % 10'luk AlCl_3 çözeltisi eklendi ve 6 dk inkübasyondan sonra karışıma 2 mL % 4,0 (a/h)'lık NaOH çözeltisi ilave edildi. Son olarak karışımın toplam hacmi 5 mL'ye distile su ile tamamlandı ve bunu takip eden 15 dk sonunda alkali ortamda pembe renkli flavonoid-alüminyum kompleksinin maksimum absorbans yaptığı 510 nm'de referans çözeltiliye karşı absorbans değerleri ölçüldü. (Samatha ve ark., 2012).

Kersetinin kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Kersetinin kalibrasyon eğrisinden doğru denkleminin elde edilebilmesi için öncelikle kersetinin 10 mg/mL'lik stok çözeltisi etanol ile hazırlandı. Bu çözeltinin etanol ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,125-2,0 mg/mL aralığındaki çözeltiler elde edildi. Çözeltilere toplam flavonoid miktar tayin metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 510 nm'de referans çözeltiliye karşı kaydedildi.

Ekstrelerin toplam flavonoid miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

$$\text{Absorbans} = 1,5460 \text{ kersetin (mg)} + 0,2210 \quad (R^2: 0,9904)$$



Şekil 3.2 Kersetinin kalibrasyon eğrisi

3.10. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

3.10.1 Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)

Ekstrelerin bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemle göre yapıldı (Apak ve ark., 2004).

Bir deney tüpü içerisine 10 mM bakır (II) çözeltisi, 7,5 mM neokuproin (Nc) çözeltisi ve 1,0 M amonyum asetat (NH₄Ac) tampon çözeltisinden sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine 0,05; 0,10; 0,25 mg/mL konsantrasyonlardaki bitkinin çiçek, yaprak ve gövdesinden 1'er mL eklendi ve 0,1 mL de EtOH (bitki ekstralarının hazırlandığı çözücü ortamı) çözücüsü eklendi. Toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde hazırlandıktan sonra tüpler ağzı kapalı olarak oda sıcaklığında 30 dk reaksiyonun oluşması için bekletildi. Süresi biten her bir örneğin, içerisinde bitki ekstresi yerine EtOH içeren referans çözeltiye karşı, oluşan Cu(I)-Nc kelatının renginin karakteristik dalgaboyu olan 450 nm'de absorbansları ölçüldü.

1mL Cu(II) + 1mL Nc + 1mL NH₄Ac + 1mL bitki ekstresi + 0,1 mL EtOH

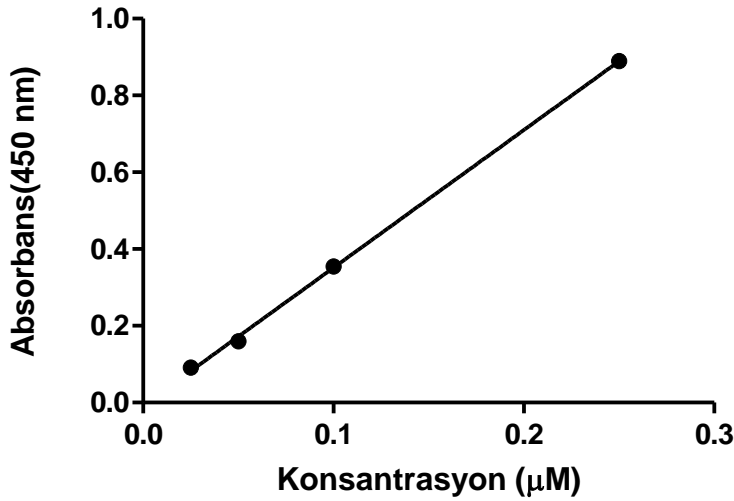
V_{toplam} = 4,1 mL

Troloksun kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Troloksun kalibrasyon eğrisinden doğru denkleminin elde edilebilmesi için öncelikle troloksun 4,0 µM 10 mL'lik stok çözeltisi etanol ile hazırlandı. Bu çözeltinin etanol ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,025-0,25 µM aralığındaki çözeltiler elde edildi. Çözeltilere CUPRAC metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbanları 450 nm'de referans çözeltiliye karşı kaydedildi (Şekil 3.3).

Ekstrelerin CUPRAC değerleri troloks grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

$$\text{Absorbans} = 3,5858 \text{ troloks } (\mu\text{M}) - 0,0072 \quad (R^2: 0,9994)$$



Şekil 3.3 Troloksun kalibrasyon eğrisi

3.10.2 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (FRAP)

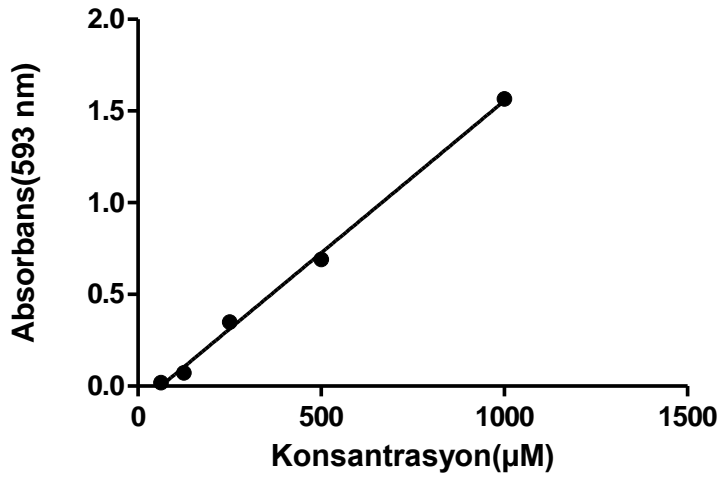
FRAP ayıracı, 25 mL 300 mM asetat tamponu (pH 3,6), 2,5 mL TPTZ çözeltisi (10 mM TPTZ'nin 40 mM HCl'deki çözeltisi) ve 2,5 mL 20 mM FeCl₃.6H₂O'nin karıştırılması ile hazırlandı ve 37 °C de 30 dk bekletildi. FRAP ayıracınının 3,8 mL 'si, 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL konsantrasyonlardaki bitkinin çiçek, yaprak ve gövdesinden 0,2'şer mL veya 0,2 mL askorbik asit standartı ile karıştırılarak, ekstre yerine etanol konularak hazırlanan referansa karşı absorban artışı 4. dakikada 593 nm'de ölçüldü. (Benzie ve Strain, 1996).

FeSO₄'ün kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

FeSO₄'ün doğru denkleminin elde edilebilmesi için öncelikle FeSO₄'ün 2,0 M 50 mL'lik stok çözeltisi distile suyla hazırlandı. Bu çözeltinin su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 62,5-1000 µM'lık çözeltileri elde edildi. Çözeltilere FRAP metodu uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 593 nm'de referans çözeltiliye karşı kaydedildi (Şekil 3.4).

Ekstrelerin FRAP değerleri FeSO₄ grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

$$\text{Absorbans} = 1,675 \text{ FeSO}_4 (\mu\text{M}) - 0,1216 \quad (R^2: 0,9983)$$



Şekil 3.4 FeSO₄'ün kalibrasyon eğrisi

3.10.3 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)

ABTS kation radikali, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiozin-6-sulfonik asit) amonyum tuzu (ABTS²⁻)'nin peroksodisülfatla oksidasyonu sonucu meydana gelir. 7 mM ABTS amonyum tuzu suda çözüldü ve 2,45 mM potasyum peroksodisülfatla reaksiyona sokularak hazırlanan ABTS⁺⁺ stok çözeltisi oda sıcaklığında koyu mavi bir renk meydana gelmesini sağlamak için 14 saat bekletildi. ABTS⁺⁺ stok çözeltisi, 734 nm'de absorbansı 0,702 olacak şekilde % 99'lık etanol ile seyreltilerek ABTS⁺⁺ çalışma çözeltisi hazırlandı.

2,0-0,25 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden ve 1,0-0,125 mg/mL konsantrasyonlarda etanol ile hazırlanan BHA çözeltilerinden 40'ar µL alınarak, 4

mL ABTS^{•+} çalışma çözeltisi ilave edildi ve renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm’de etanole karşı 6. dk’da kaydedildi.

Ekstre ve standart madde yerine 40 µL etanol (% 96’lık) kullanılarak aynı şartlarda kontrol çözeltisi hazırlandı ve 734 nm’de etanole karşı absorbansı ölçüldü. Deney üç kez tekrarlanarak absorbansların ortalaması alındı (Wojdylo ve ark., 2007).

% ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100]$$

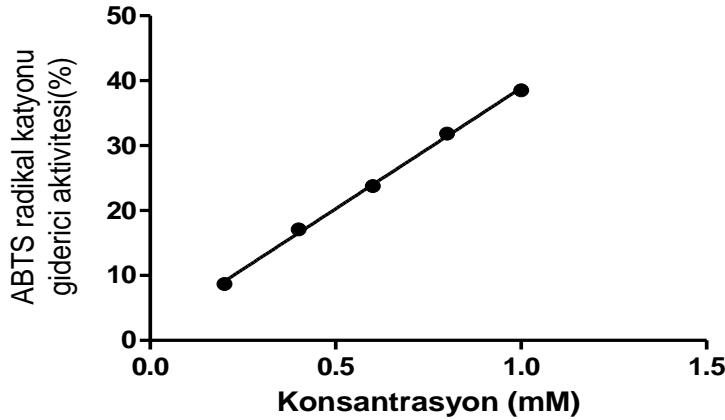
A_0 : Kontrol reaksiyonunun absorbansı,

A_1 : Bitki ekstraları ve standart çözeltilerin absorbansı

Troloks’a TEAC yöntemi uygulanarak doğrusallığının belirlenmesi

Troloksun standart doğru denkleminin eldesi için öncelikle troloks’un 10 mM’lık stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin 75 mM’lık fosfat tamponu (pH 7,4) ile seyreltilmesiyle 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 mM konsantrasyonlardaki olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere TEAC deneyi uygulandıktan sonra renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm’de 6. dakikada ölçüldü ve troloks’un ABTS radikal katyonu giderici kapasite yüzdeleri hesaplandı. Deney üç kez tekrarlandı ve bulunan değerlerin ortalamaları alınarak en küçük kareler yöntemiyle troloksun kalibrasyon eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3.5).

$$\text{Absorbans} = 37,22 \text{ troloks (mM)} + 1,66 \quad R^2: 0,9986$$



Şekil 3.5 Troloksun kalibrasyon eğrisi ve doğru denklemi

3.10.4 DPPH (2,2–difenil–1–pikrilhidrazil) radikali giderme kapasitesinin tayini

Bitkinin çiçek, gövde ve yaprak kısımlarından etanol ile 4,00-0,125 mg/mL konsantrasyon aralığındaki ekstreler hazırlandı. Standart çözelti olarak askorbik asit ile BHT kullanıldı. Bu standart çözeltilerin ise 0,5-0,025 mg/mL konsantrasyon aralığındaki çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan her bir ekstreten 0,1'er mL alınarak üzerine 3,9 mL $6,0 \cdot 10^{-5}$ M DPPH çözeltisi ilave edildi. DPPH çözeltisi ilave edilen ekstreler ve standart çözeltiler karıştırıldıktan sonra oda koşullarında ve karanlıkta 30 dk bekletildi. Örneklerin absorbansları 517 nm'de spektrofotometrede etanole karşı ölçüldü. Örnek ve standart madde yerine 0,1 mL etanol kullanılarak aynı şartlarda kontrol çözeltisi hazırlandı. Her bir deney üç kere tekrarlandı ve absorbansların ortalaması alındı (Padmanabhan ve Jangle, 2012).

IC₅₀ değeri hesaplanmadan önce % DPPH radikali giderme kapasitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\% \text{ DPPH Radikali Giderme Kapasitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100]$$

A₀ : Kontrol çözeltisinin absorbansı,

A₁ : Bitki ekstreleri ve standart çözeltilerin absorbansı

Başlangıç DPPH' derişiminde % 50 azalmaya neden olan ekstre ve standart madde konsantrasyonu IC₅₀ olarak tanımlanır. IC₅₀ değeri çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme kapasite değerlerinin grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen doğru denklemi ile mg/mL olarak hesaplandı.

3.10.5 A. *grandifolia* bitkisinin metal kelatı oluşturma kapasitesinin tayini

5,0 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan ekstrelerden ve standart EDTA çözeltisinden 200'er µL bir deney tüpü içerisine alındı, üzerine 50 µL FeCl₂ (2 mM) çözeltisi ve 350 µL distile su ilave edildi. Son hacim 4 mL olacak şekilde etanol ilave edildi. Daha sonra 200 µL ferrozin (5 mM) çözeltisi eklenerek 30 s vorteksde karıştırıldı ve reaksiyonun tamamlanması için oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Süresi dolan çözeltilerin 562 nm'deki absorbansı örnek hariç geriye kalan çözeltilerden (50 µL FeCl₂, 350 µL distile su, 3400 µL etanol, 200 µL ferrozin) oluşan referansa karşı kaydedildi. Kontrol çözeltisinin absorbansı ise örneği içermeyen karışımın etanole karşı gösterdiği absorbans değeri olarak kaydedildi (Bakır ve Özmen, 2012).

Ferrozin-Fe²⁺ kompleksi oluşumunu engelleme yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanacaktır.

$$\% \text{ Kelatlama aktivitesi} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100]$$

A₀ : Kontrol reaksiyonunun absorbanı,

A₁ : Bitki ekstraktları ve standart çözeltilerin absorbanı

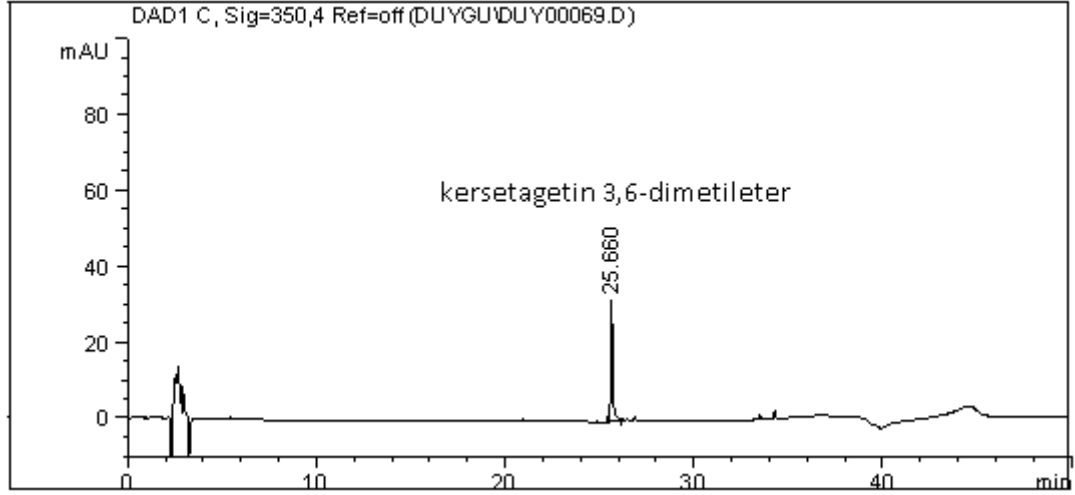
3.10.6 İstatistiksel hesaplamalar

Çalışma sonucunda elde edilen veriler üç paralel testin ortalaması \pm standart sapması olarak verildi. En küçük kareler yönteminin kullanıldığı doğrusal regresyon analizi eğim, intersept ve korelasyon katsayılarının kareleri ile değerlendirildi. Bu işlemler için Microsoft Excel ve Graphpad Prism 5 programlarından yararlanıldı.

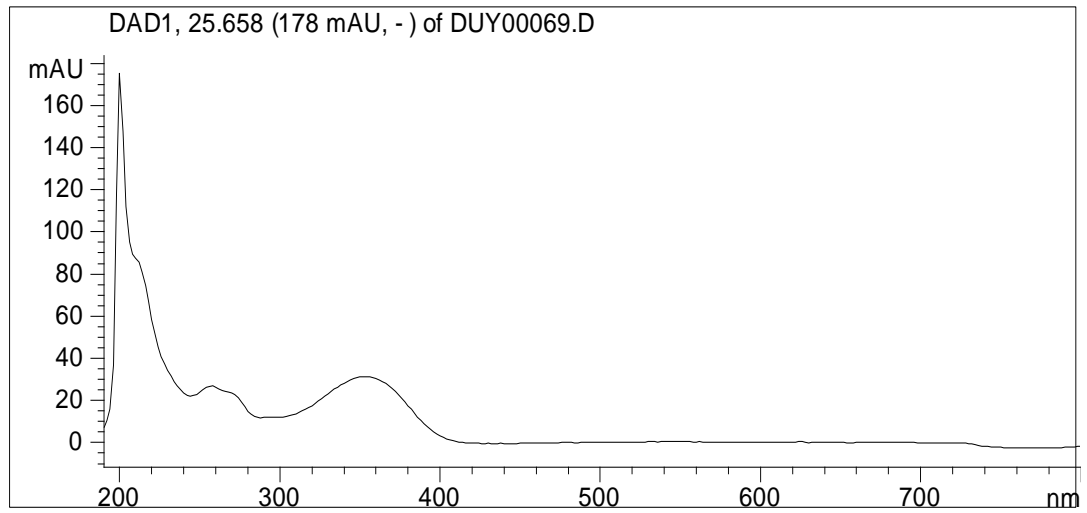
4. BULGULAR

4.1. Standart Maddelerin HPLC Kromatogramları ve Spektrumları

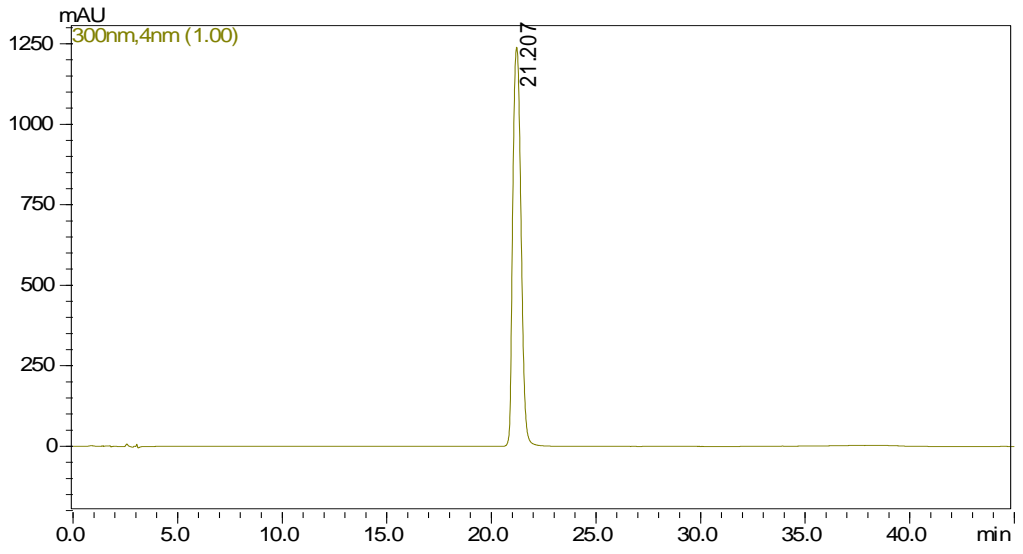
Bütün standart maddeler metanol/su (2:1) çözeltisinde çözülerek, 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden süzüldü ve HPLC'de analiz edildi. Aşağıda standartların kromatogramları ve spektrumları verilmiştir.



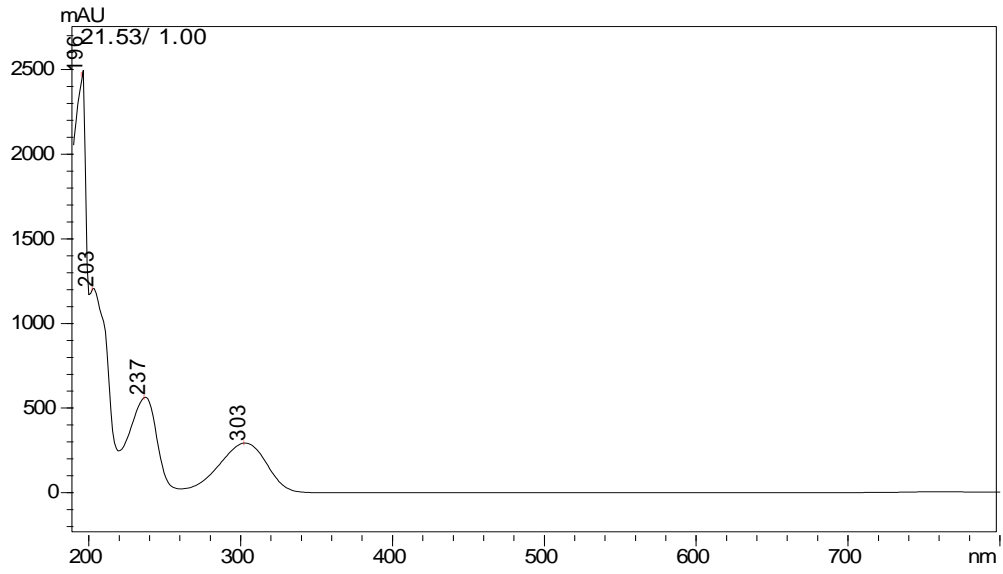
Şekil 4.1 Kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının kromatogramı



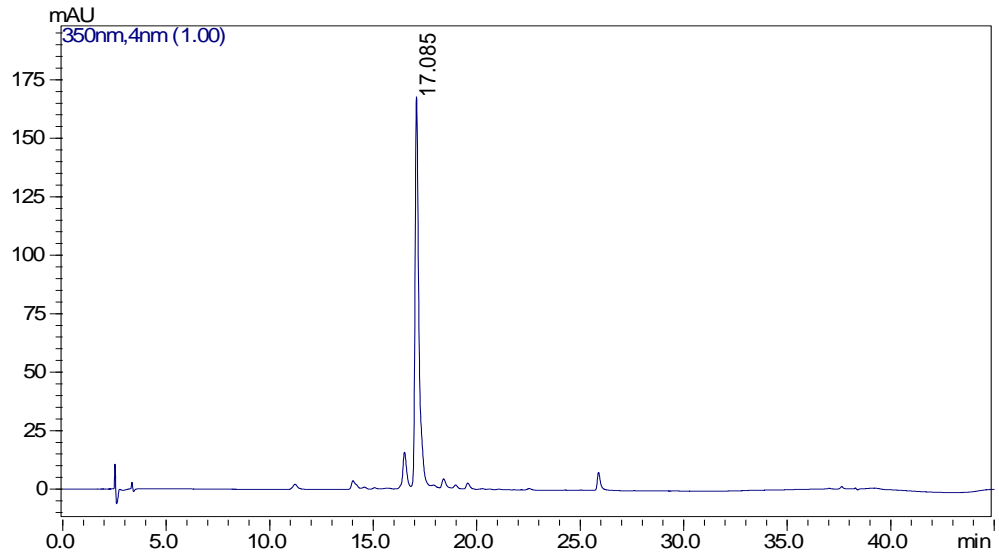
Şekil 4.2 Kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu



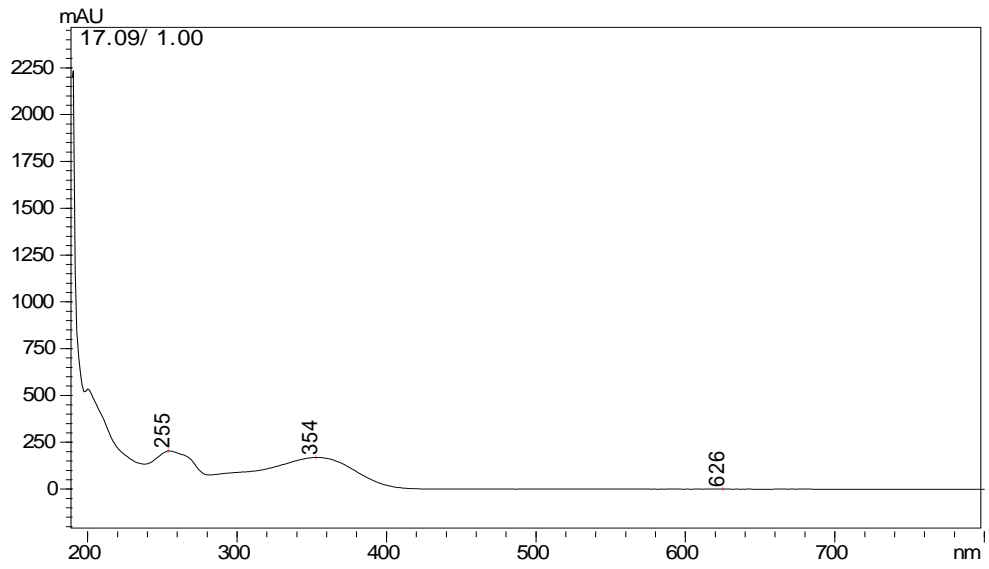
Şekil 4.3 Salisilik asit standartının kromatogramı



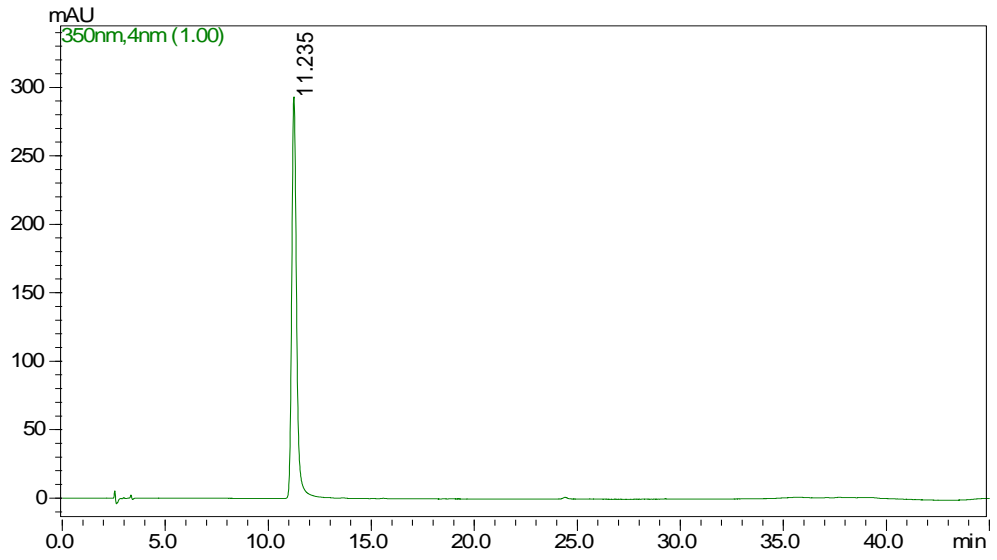
Şekil 4.4 Salisilik asit standartının spektrumu



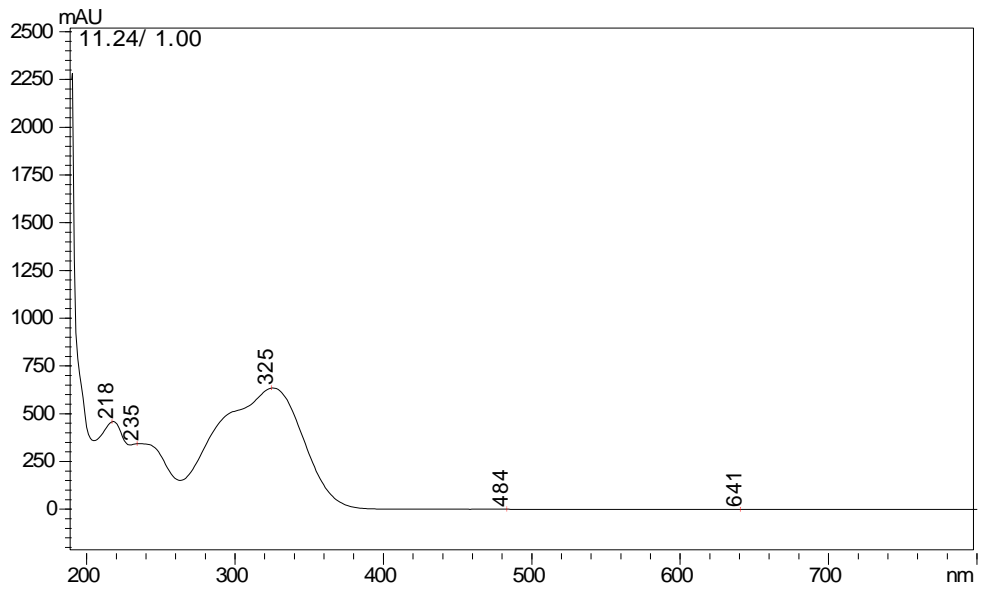
Şekil 4.5 Luteolin-7-O-glikozit standartının kromatogramı



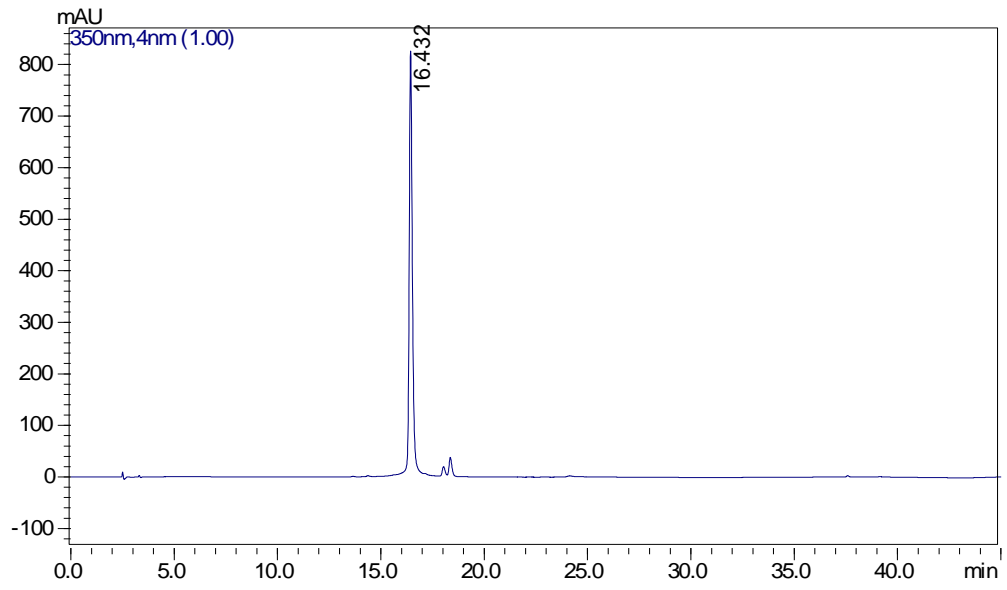
Şekil 4.6 Luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu



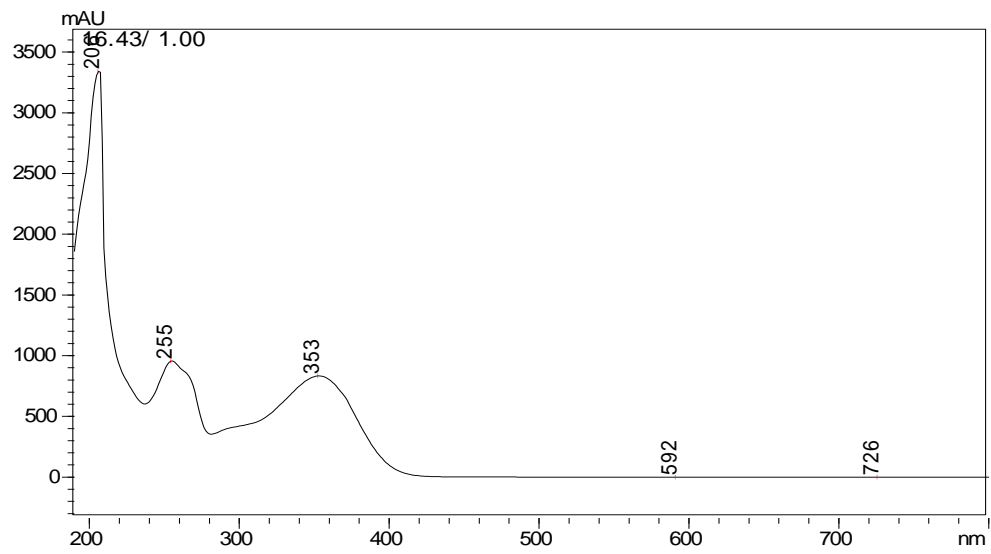
Şekil 4.7 Klorojenik asit standartının kromatogramı



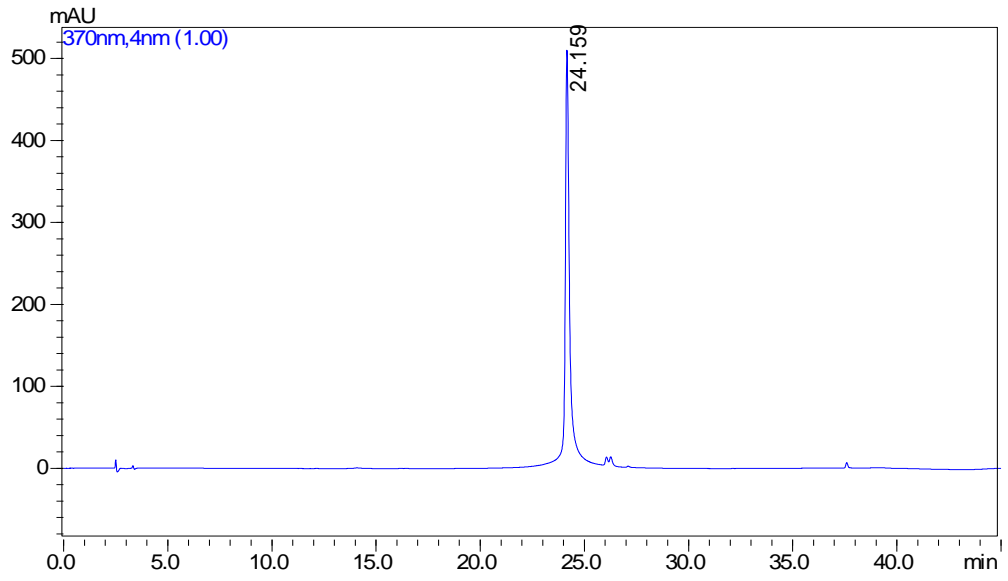
Şekil 4.8 Klorojenik asit standartının spektrumu



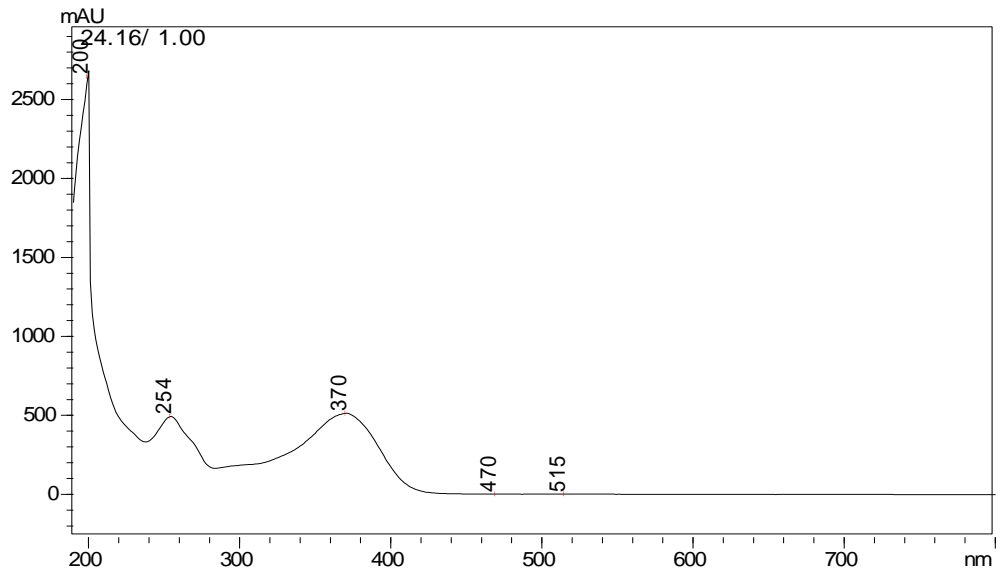
Şekil 4.9 Rutin standartının kromatogramı



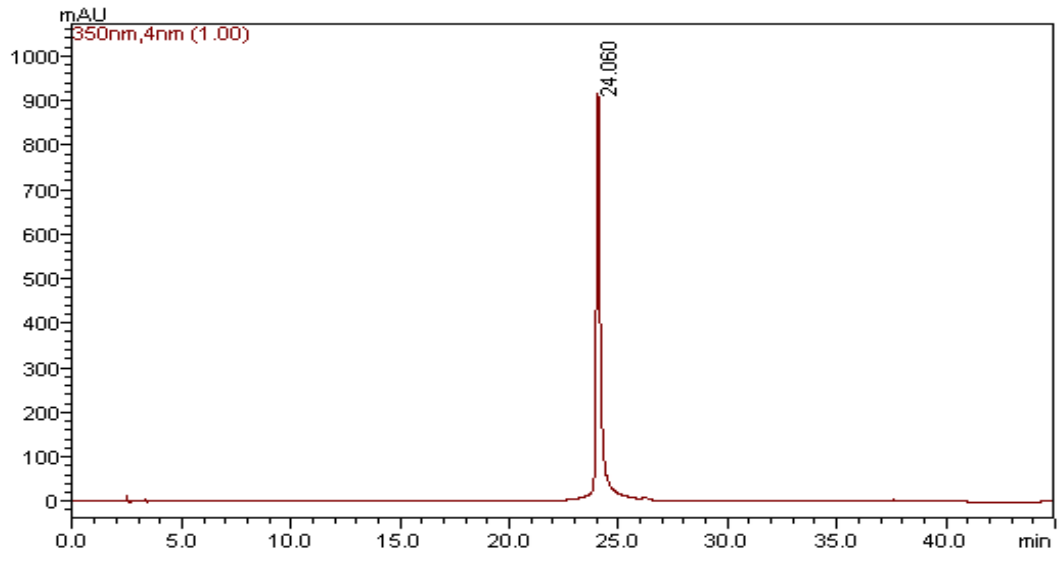
Şekil 4.10 Rutin standartının spektrumu



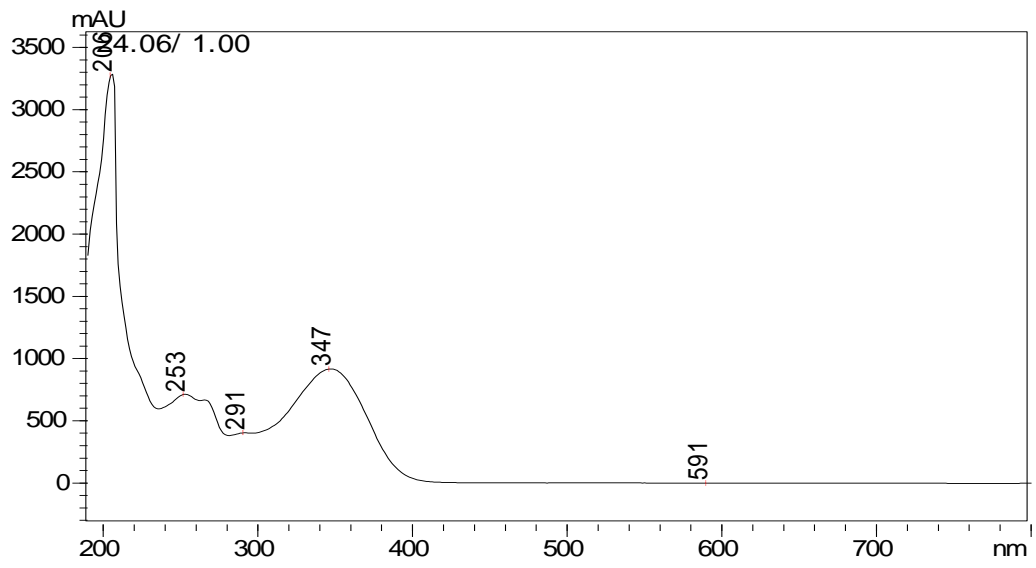
Şekil 4.11 Kersetin standartının kromatogramı



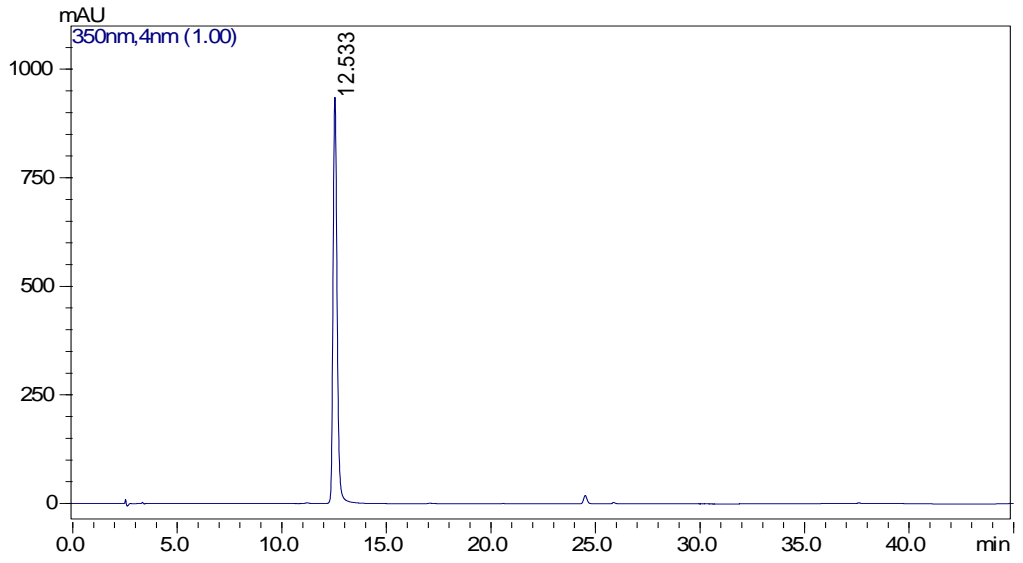
Şekil 4.12 Kersetin standartının spektrumu



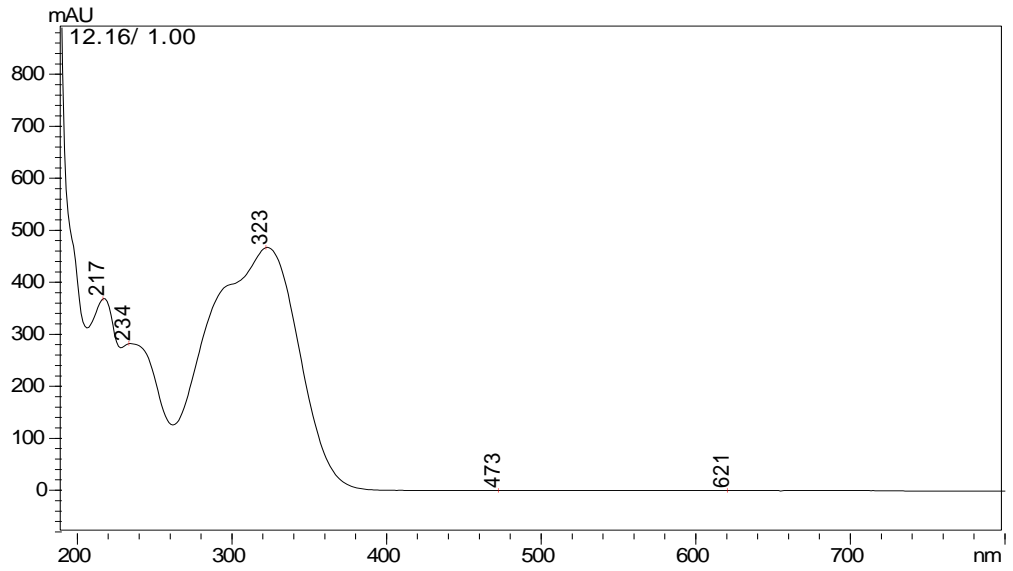
Şekil 4.13 Luteolin standartının kromatogramı



Şekil 4.14 Luteolin standartının spektrumu



Şekil 4.15 Kafeik asit standartının kromatogramı



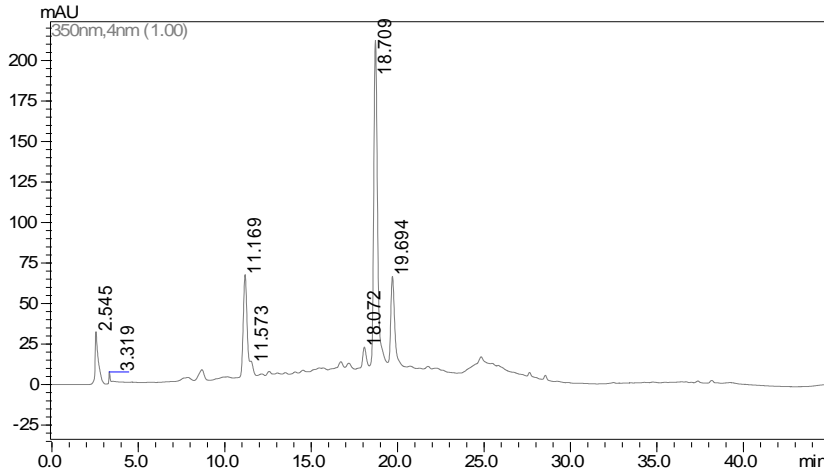
Şekil 4.16 Kafeik asit standartının spektrumu

4.2. A. grandifolia Bitkisinin Farklı Kısımlarının İçerdiği Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Sistemiyle Kalitatif Analizi

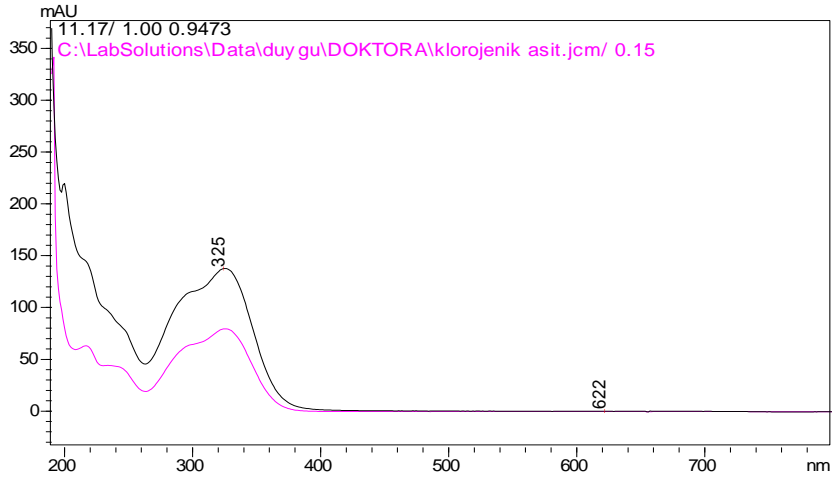
Bitkinin yaprakları, gövdesi ve çiçek kısımları ayrıldı ve bir öğütücü ile ince toz haline gelinceye kadar öğütüldü.

4.2.1 Bitkinin gövde, yaprak ve çiçek kısmının hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) yöntemiyle hazırlanmış metanol ekstratlarının HPLC sonuçları

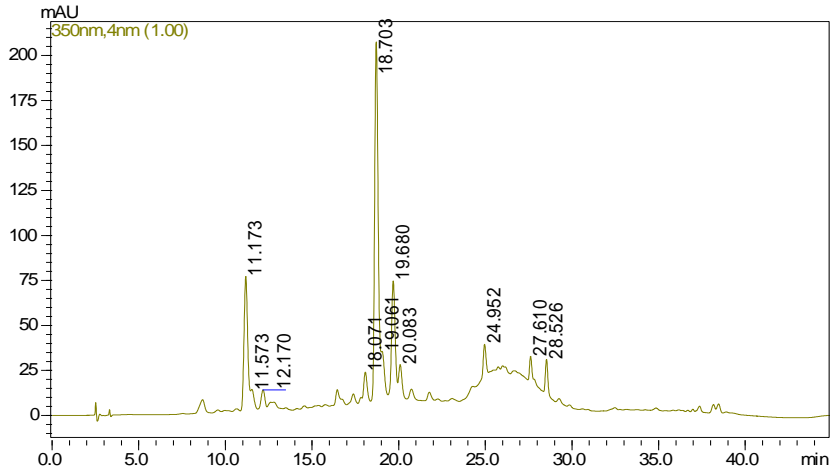
Bitkinin öğütülmüş çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından 0,5 g tartıldı ve üzerine 0,5 g diatom toprak eklenip karıştırılarak filtre kağıdına sarıldı, ekstraksiyon hücre sine yerleştirildi. Bitkinin farklı kısımları ASE’de metanol ile 40 °C’de 3 kez ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratlar döner buharlaştırıcıda uçuruldu ve geriye kalan artıklar ise metanol/su (2:1) çözeltilisinde çözüldü ve 1,0/0,45 µm’lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC’de analiz edildi. Bitkinin sırasıyla gövde, yaprak ve çiçek kısımlarından hazırlanan metanol ekstratlarının 350 nm’deki kromatogramları ve bu kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar ile standart maddelerin spektrumlarının karşılaştırılması verilmiştir (Şekil 4.17-4.26).



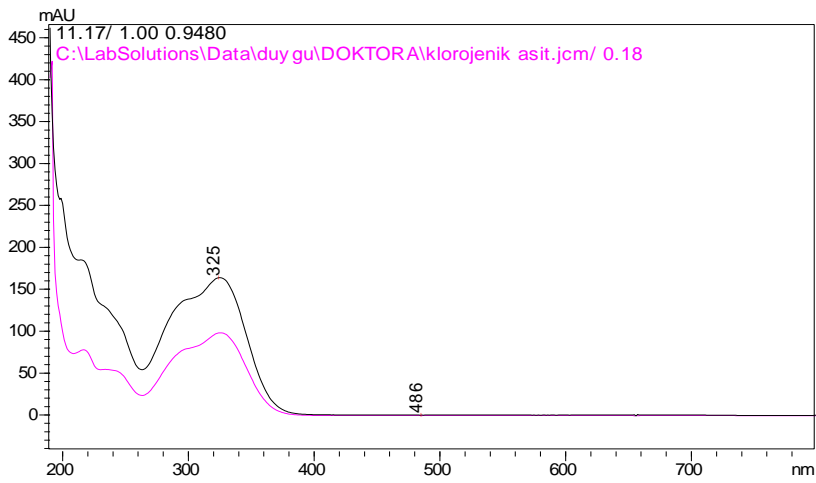
Şekil 4.17 Bitkinin gövdesinden ASE yöntemiyle hazırlanan MeOH ekstresinin kromatogramı



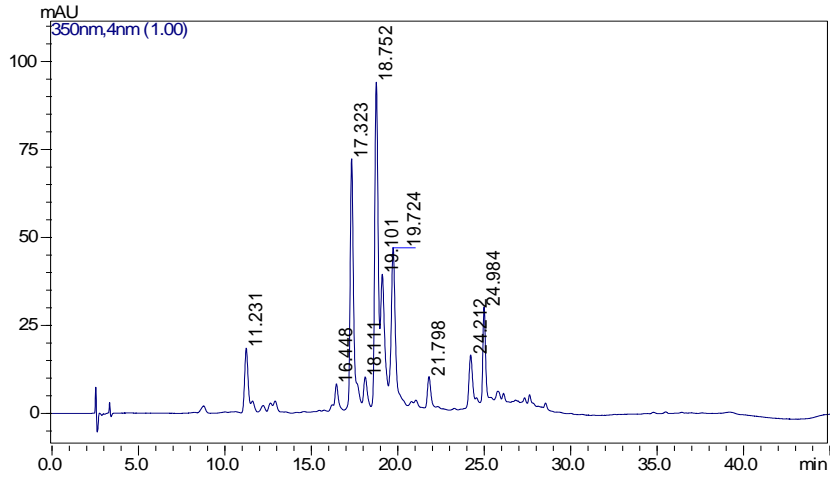
Şekil 4.18 _____:t_R: 11,169 (gövde); _____:klorojenik asit standartının spektrumu



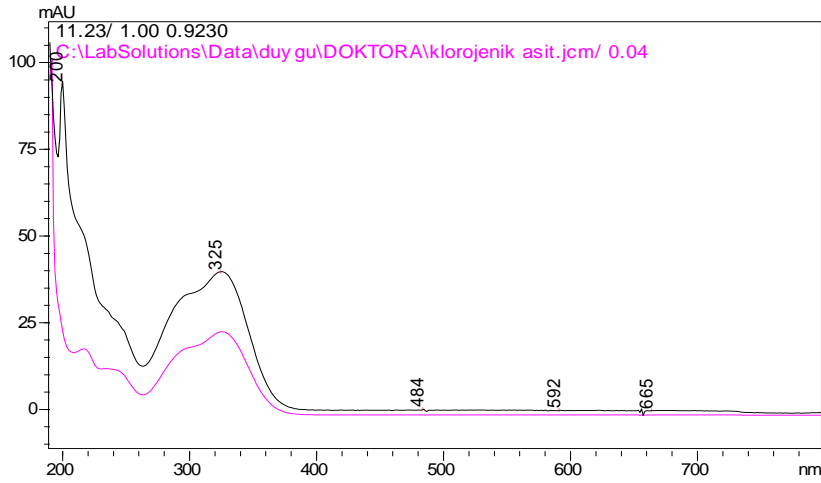
Şekil 4.19 Bitkinin yaprağından ASE yöntemiyle hazırlanan MeOH ekstresinin kromatogramı



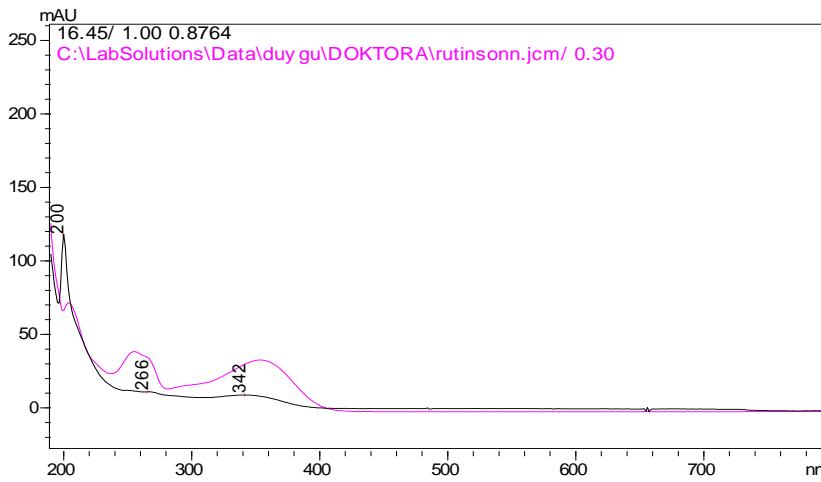
Şekil 4.20 _____:t_R: 11,173 (yaprak); _____:klorojenik asit standartının spektrumu



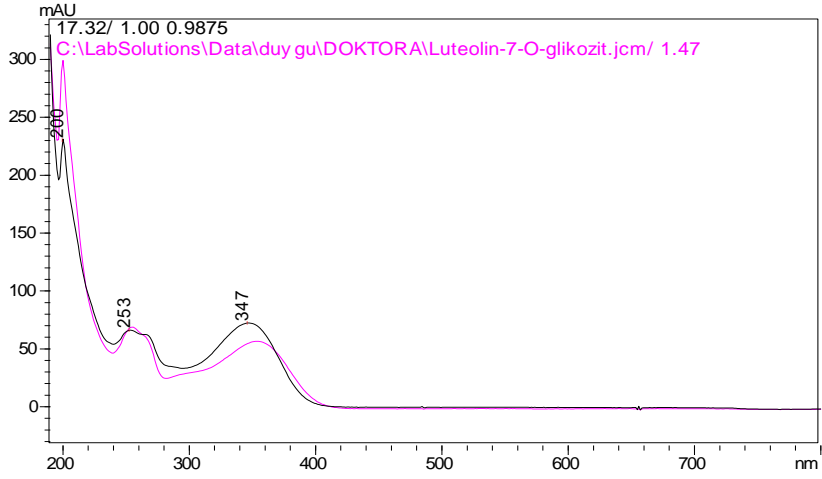
Şekil 4.21 Bitkinin çiçeğinden ASE yöntemiyle hazırlanan MeOH ekstresinin kromatogramı



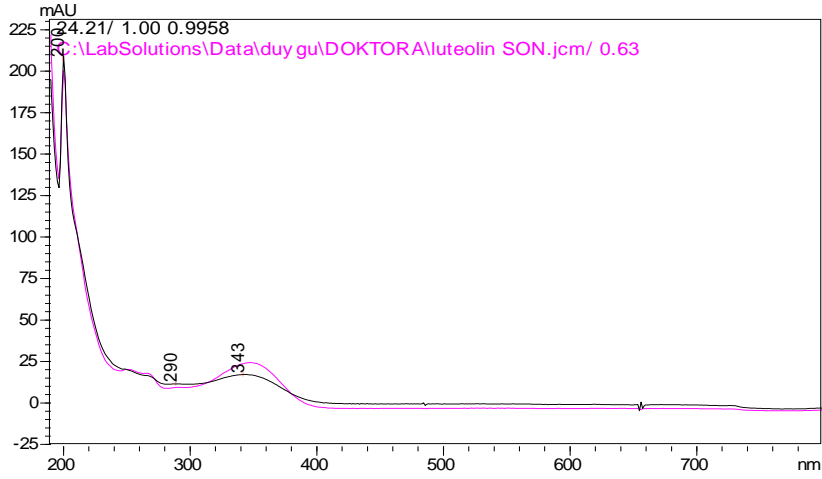
Şekil 4.22 _____:t_R: 11,231 (çiçek); _____:klorojenik asit standartının spektrumu



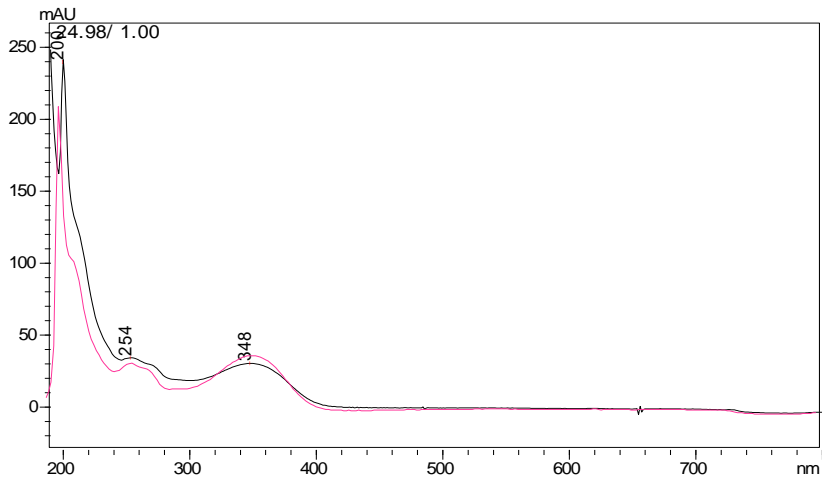
Şekil 4.23 _____:t_R: 16,448 (çiçek); _____:rutin standartının spektrumu



Şekil 4.24 _____:t_R:17,323(çiçek); _____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu



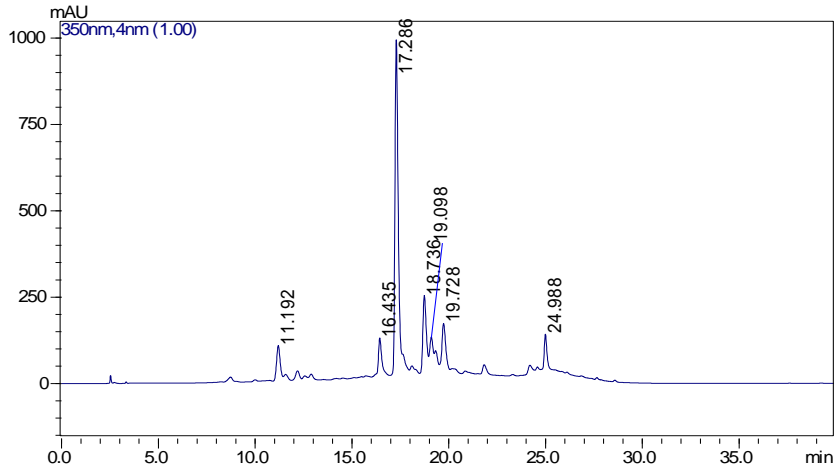
Şekil 4.25 _____:t_R:24,212(çiçek); _____:luteolin standartının spektrumu



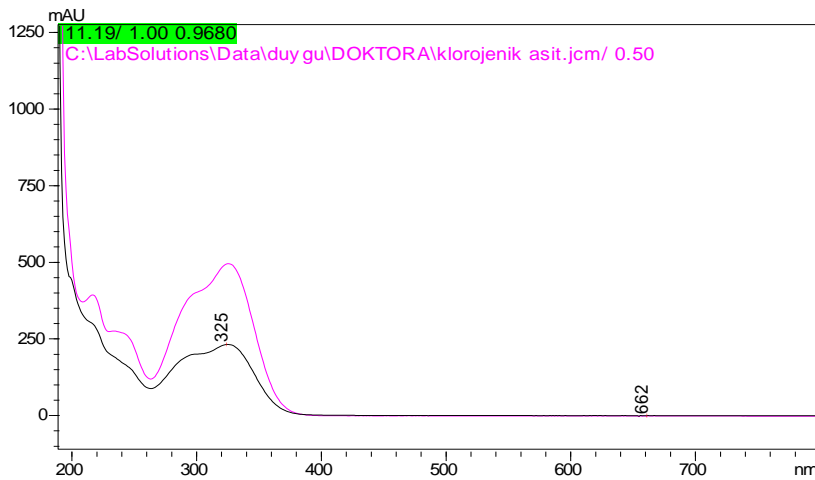
Şekil 4.26 _____:t_R:24,984 (çiçek); _____:kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu

4.2.2 Bitkinin yaprağından soxhlet aparatı ile hazırlanan etanol ekstresinin HPLC sonuçları

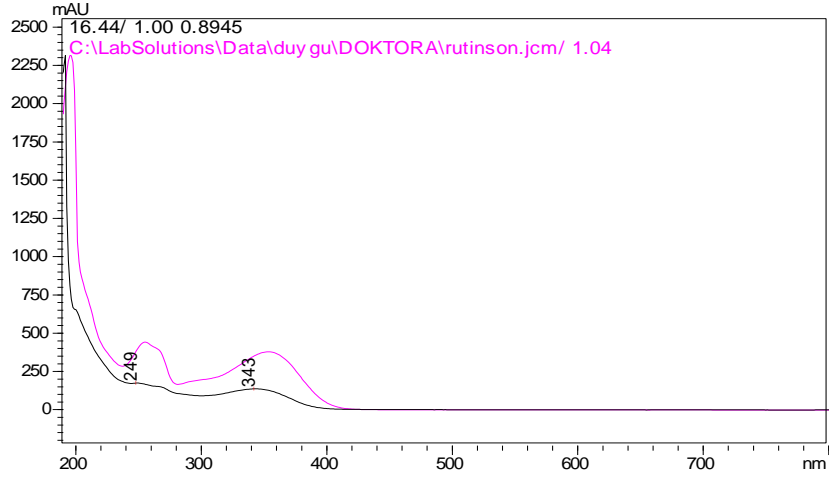
Bitkinin öğütülmüş yaprak kısmından 1,0 g tartılıp etanol ile soxhlet aparatı kullanılarak 85-90 °C aralığında yaklaşık 7 sa boyunca ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrenin çözücüsü evaporatörde uçuruldu ve geriye kalan artık ise metanol/su (2:1) çözeltilisinde çözüldü, 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edildi. Bitkinin yaprağından elde edilen etanol ekstresinin kromatogramı ve bu kromatogramdaki piklere ait spektrumlar ile standart maddelerin spektrumlarının karşılaştırılması aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



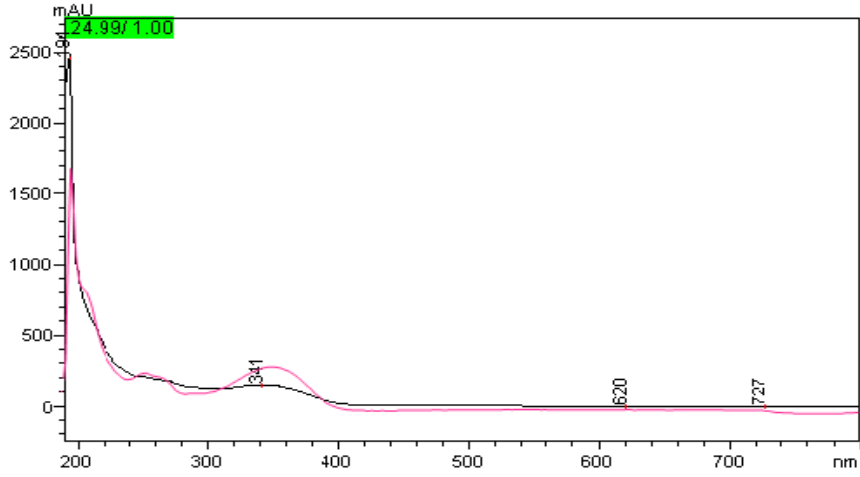
Şekil 4.27 Bitkinin yaprağından soxhlet aparatı kullanılarak hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı



Şekil 4.28 _____:tr: 11,192 (yaprak); _____:klorojenik asit standartının spektrumu



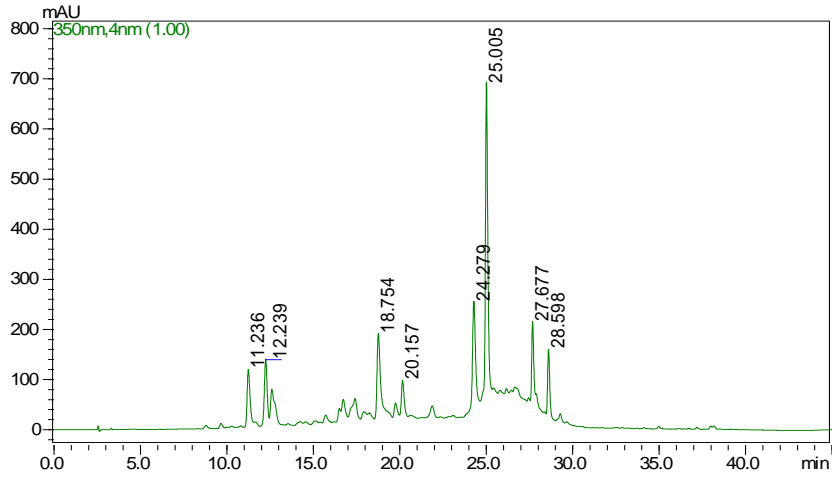
Şekil 4.29 _____:t_R: 16,435 (yaprak); _____:rutin standartının spektrumu



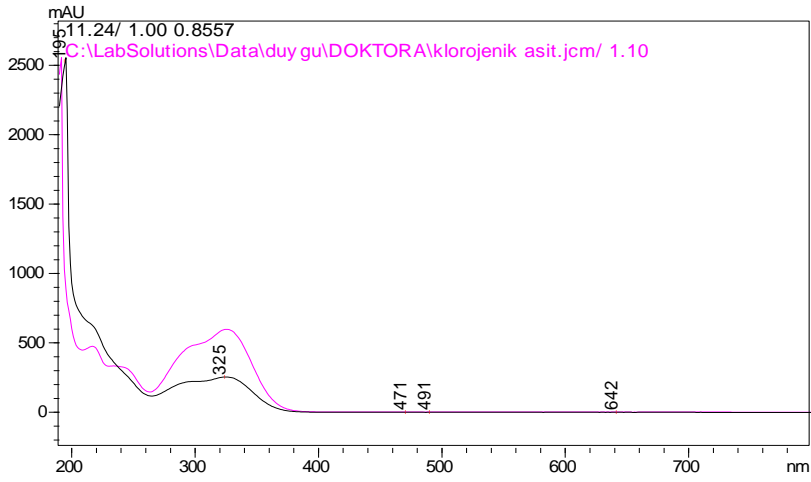
Şekil 4.30 _____:t_R:24,988(yaprak); _____:kersetageetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu

4.2.3 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından soxhlet aparatı ile hazırlanan etil asetat ekstresinin HPLC sonuçları

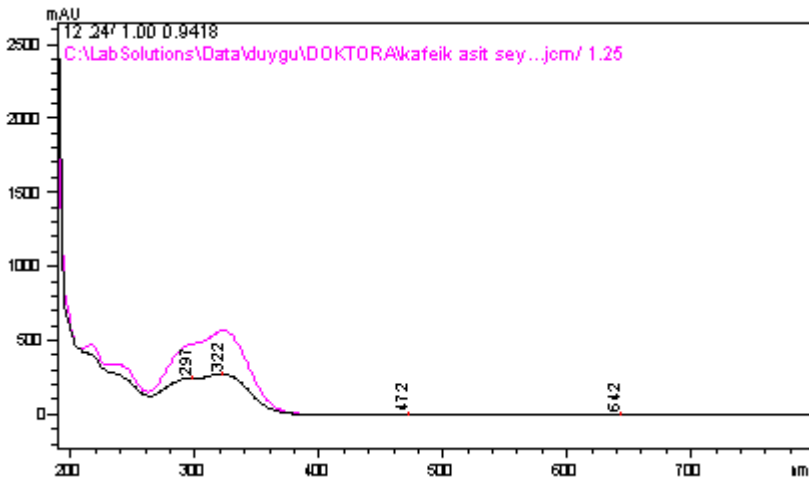
Bitkinin öğütülmüş çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından 1,0'er g tartıldı ve etil asetat (EtOAc) ile soxhlet aparatı kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratlar evaporatörde uçuruldu ve geriye kalan artıklar ise metanol/su (2:1) çözeltisinde çözüldü ve 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edildi. Bitkinin sırasıyla, yaprak, çiçek ve gövde kısımlarının etil asetat ile hazırlanan ekstraksiyonları sonucu elde edilen ekstratların kromatogramları ve bu kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar ile standart maddelerin spektrumlarının karşılaştırılması aşağıdaki Şekil 4.31-4.44'de verilmiştir.



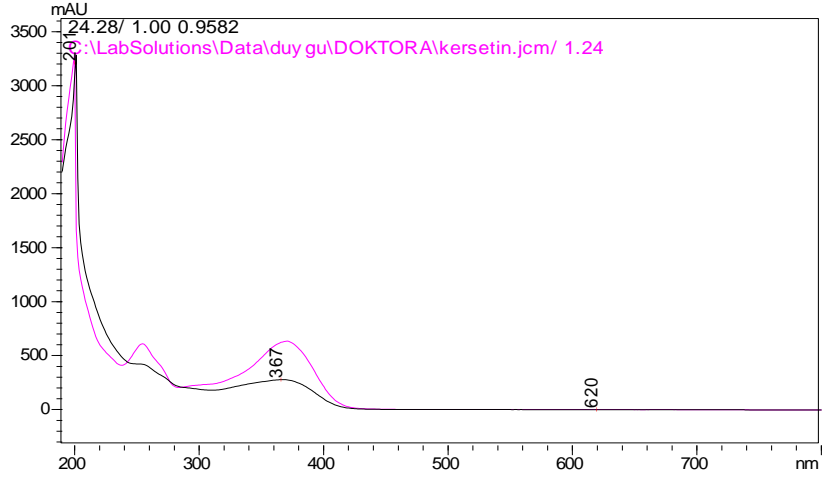
Şekil 4.31 Bitkinin yaprağından soxhlet aparatı kullanılarak hazırlanan EtOAc ekstresinin kromatogramı



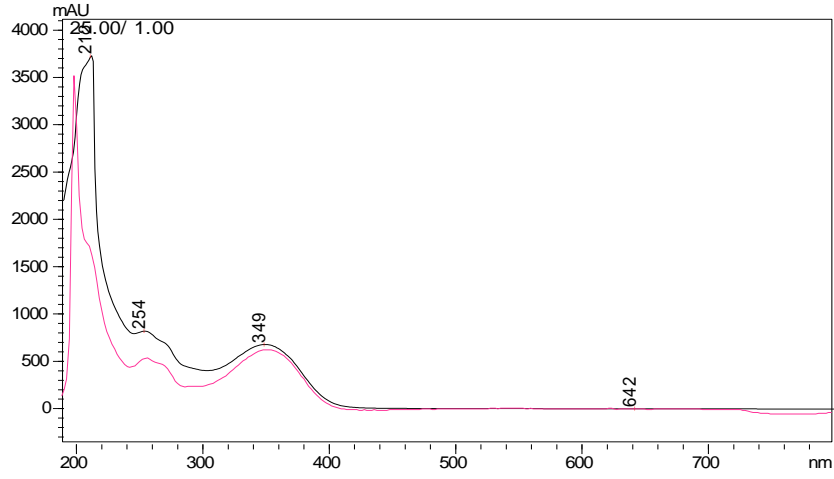
Şekil 4.32 _____:t_R: 11,236(yaprak); _____:klorojenik asit standartının spektrumu



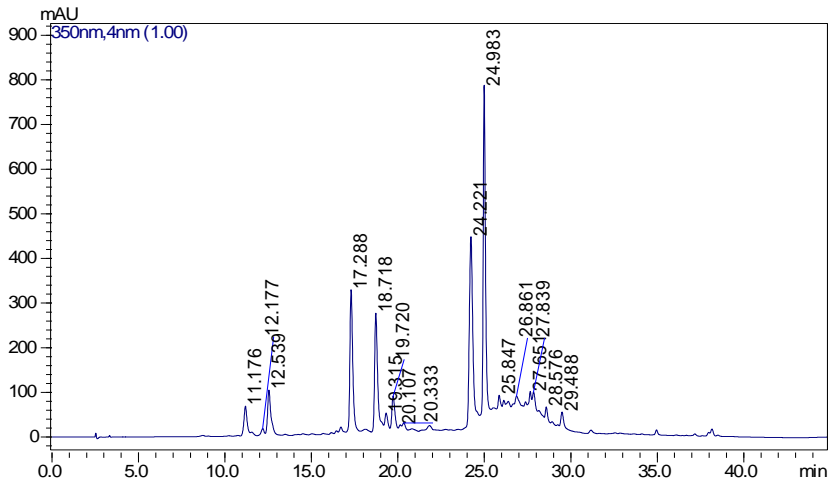
Şekil 4.33 _____:t_R: 12,239 (yaprak); _____:kafeik asit standartının spektrumu



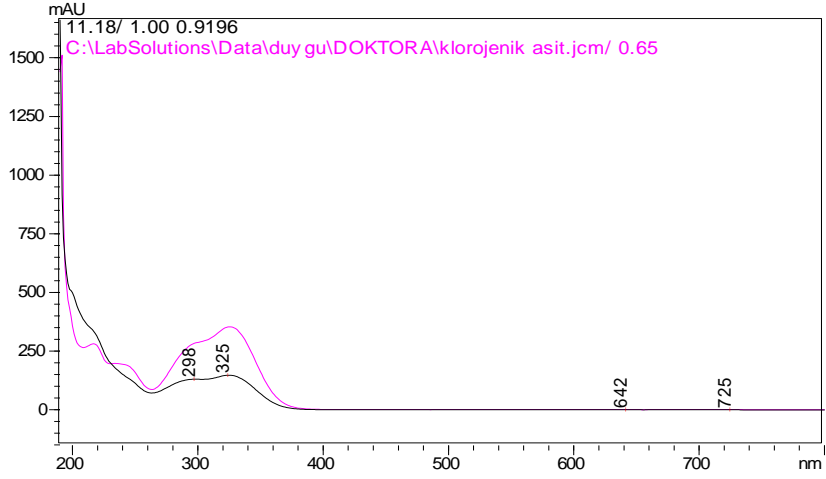
Şekil 4.34 _____:t_R: 24,279 (yaprak); _____:kersetin standartının spektrumu



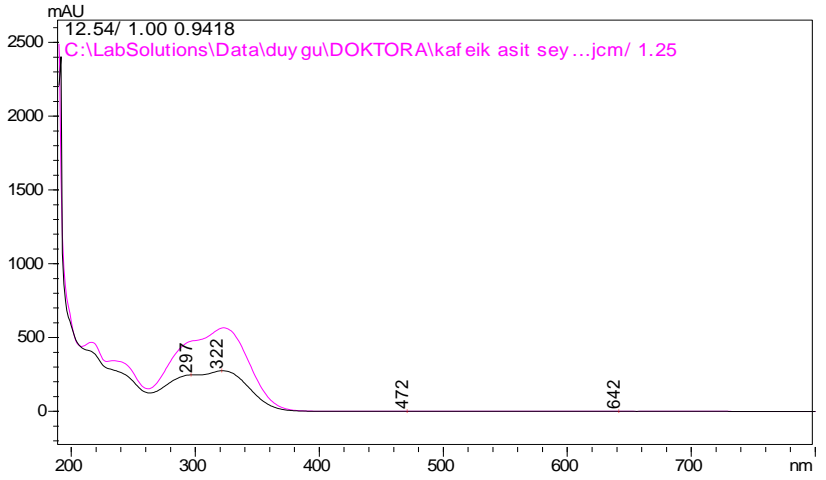
Şekil 4.35 _____:t_R: 25,005(yaprak); _____:kersetağetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu



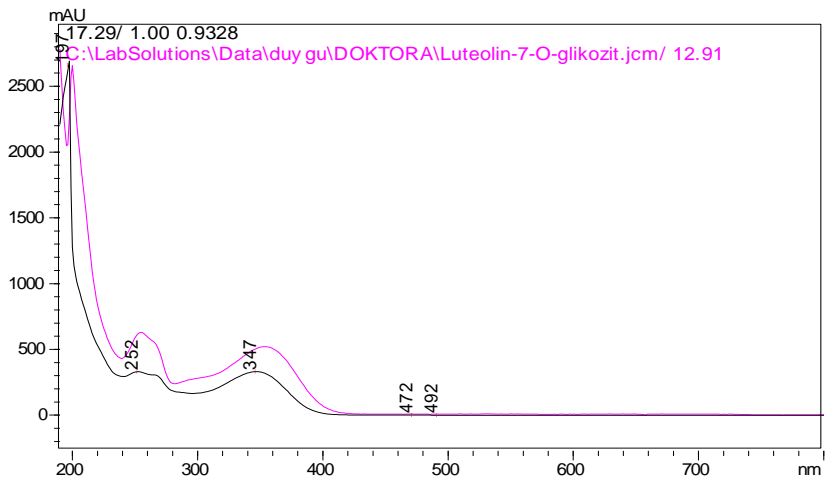
Şekil 4.36 Bitkinin çiçeğinden soxhlet aparatı kullanılarak hazırlanan EtOAc ekstresinin kromatogramı



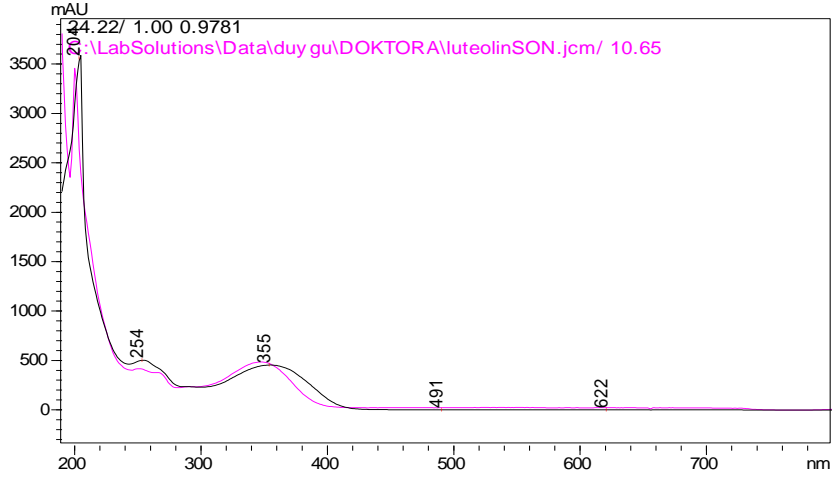
Şekil 4.37 _____:t_R:11,176 (çiçek); _____:klorojenik asit standartının spektrumu



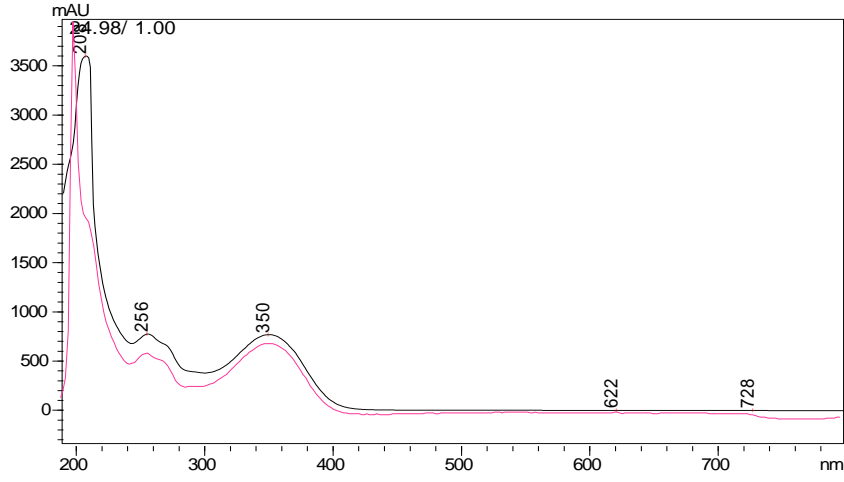
Şekil 4.38 _____:t_R:12,539 (çiçek); _____:kaf eik asit standartının spektrumu



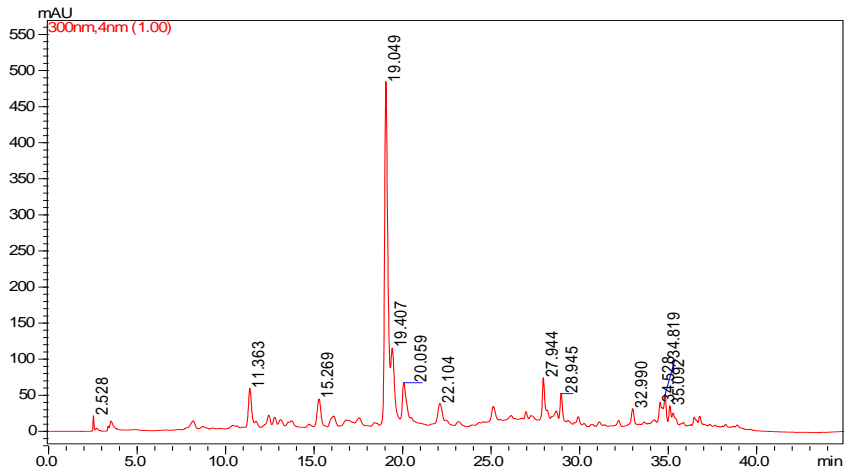
Şekil 4.39 _____:t_R:17,288(çiçek); _____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu



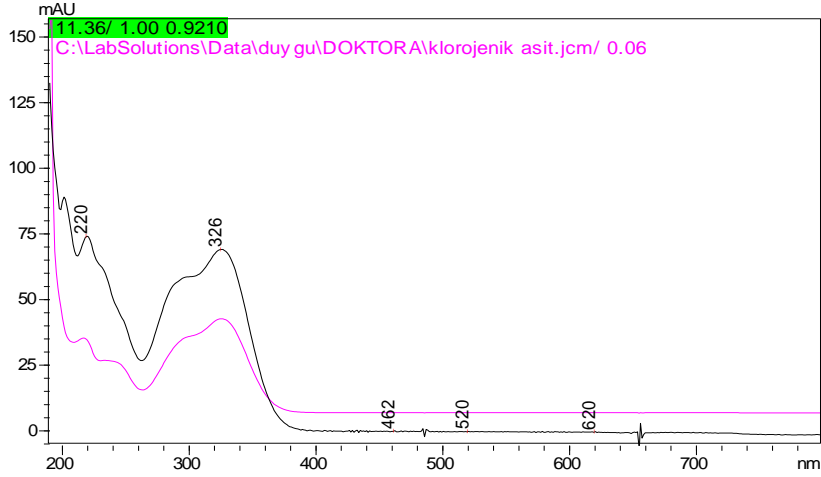
Şekil 4.40 _____:t_R: 24,221(çiçek); _____:luteolin standartının spektrumu



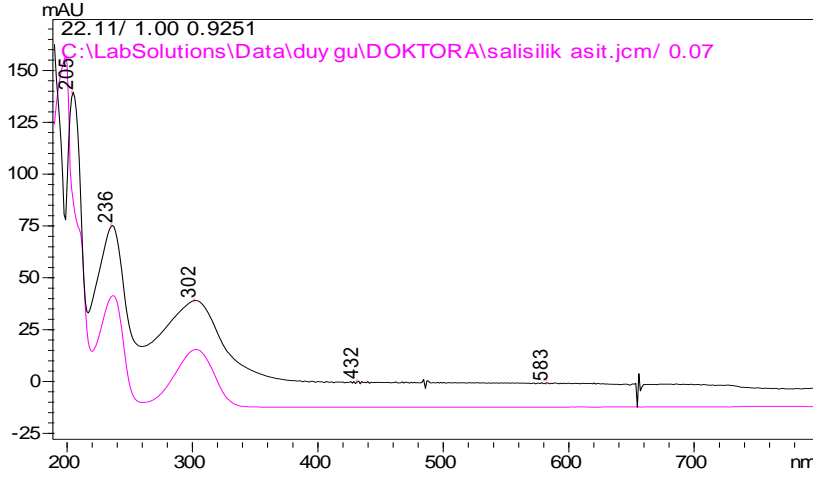
Şekil 4.41 _____:t_R: 24,983(çiçek); _____: kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu



Şekil 4.42 Bitkinin gövdesinden soxhlet aparatı kullanılarak hazırlanan EtOAc ekstresinin kromatogramı



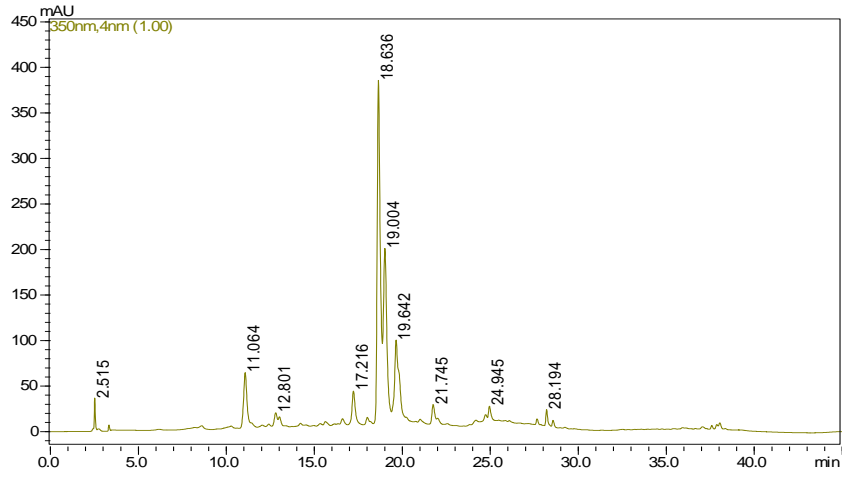
Şekil 4.43 _____:t_R: 11,363(gövde); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



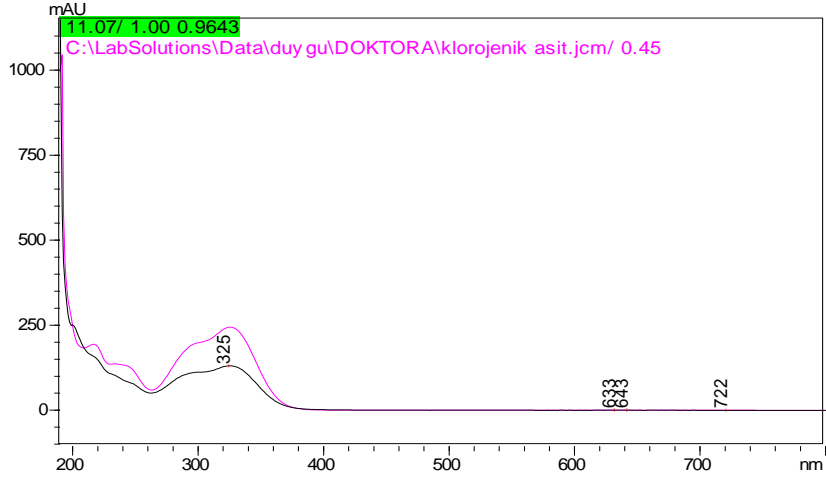
Şekil 4.44 _____:t_R: 22,104 (gövde); _____: salisilik asit standartının spektrumu

4.2.4 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından ASE ile hazırlanan etanol ekstralarının HPLC sonuçları

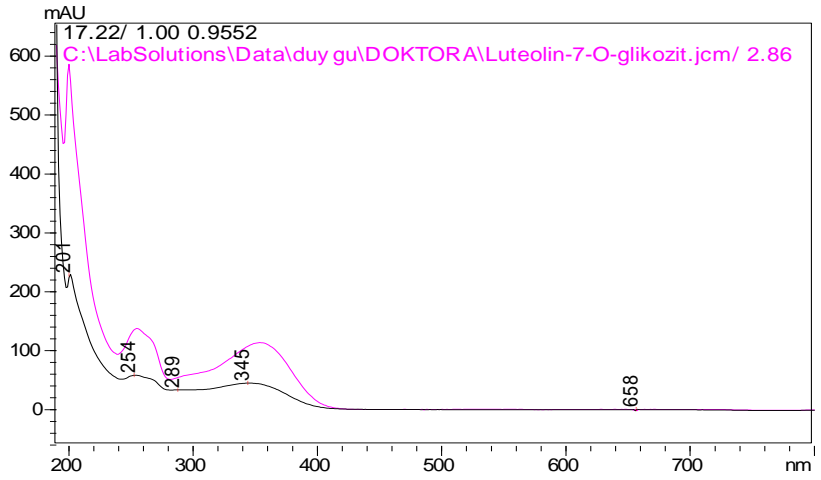
Bitkinin öğütülmüş çiçek, yaprak ve gövde kısımları etanol ile ASE'de 40 °C'de 3 kez ard arda ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratlar evaporatörde uçuruldu ve geriye kalan artıklar ise metanol/su (2:1) çözeltisinde çözüldü ve 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edildi. Bitkinin sırasıyla gövde, yaprak ve çiçek kısımlarından ASE kullanılarak hazırlanan etanol ekstralarının kromatogramları ve bu kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar ile standart maddelerin spektrumlarının karşılaştırılması aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



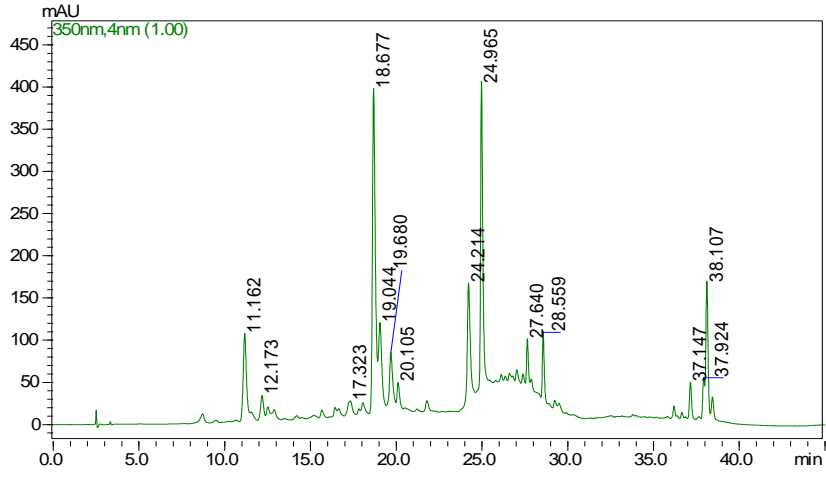
Şekil 4.45 Bitkinin gövdesinden ASE kullanılarak hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı



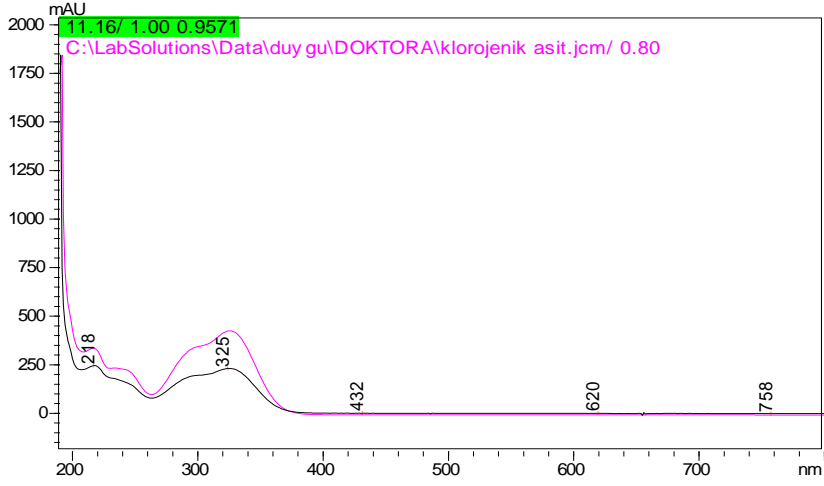
Şekil 4.46 _____:t_R: 11,064 (gövde); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



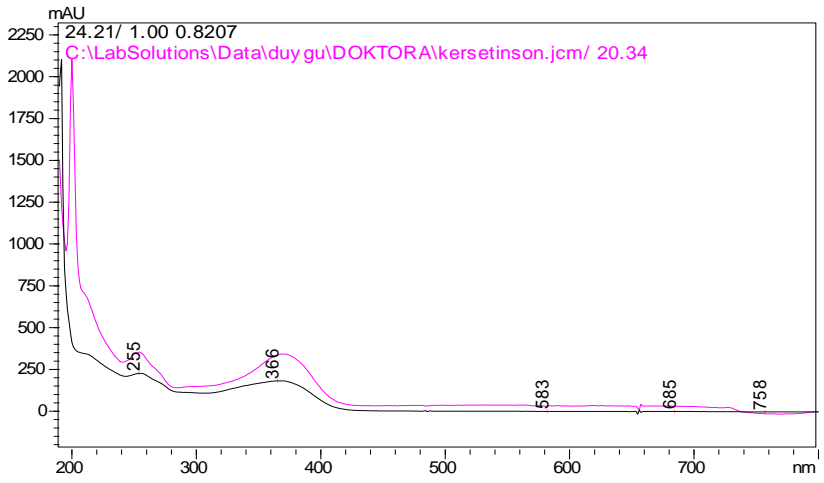
Şekil 4.47 _____:t_R: 17,216 (gövde); _____: luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu



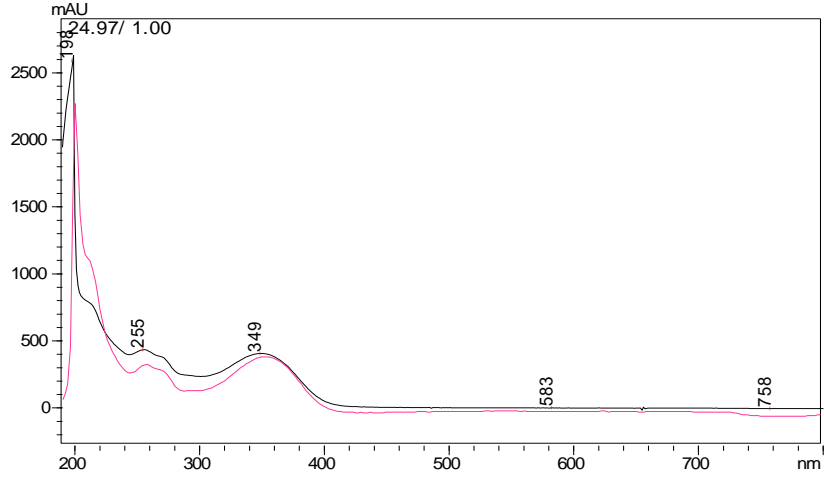
Şekil 4.48 Bitkinin yaprağından ASE kullanılarak hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı



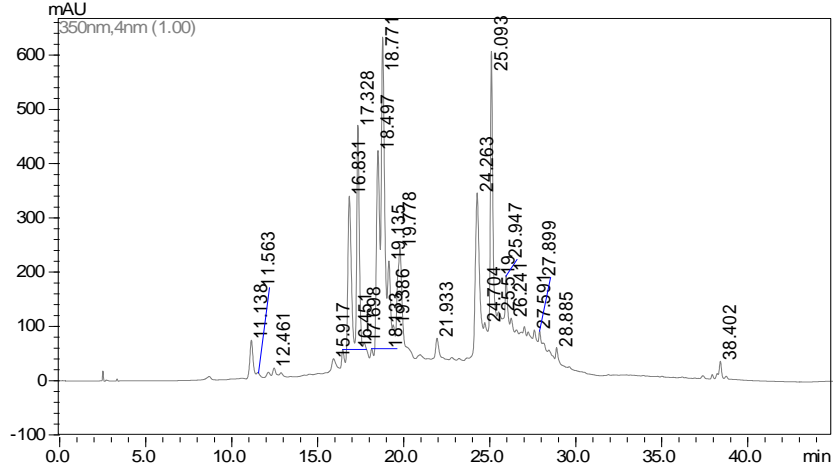
Şekil 4.49 _____:t_R: 11,162 (yaprak); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



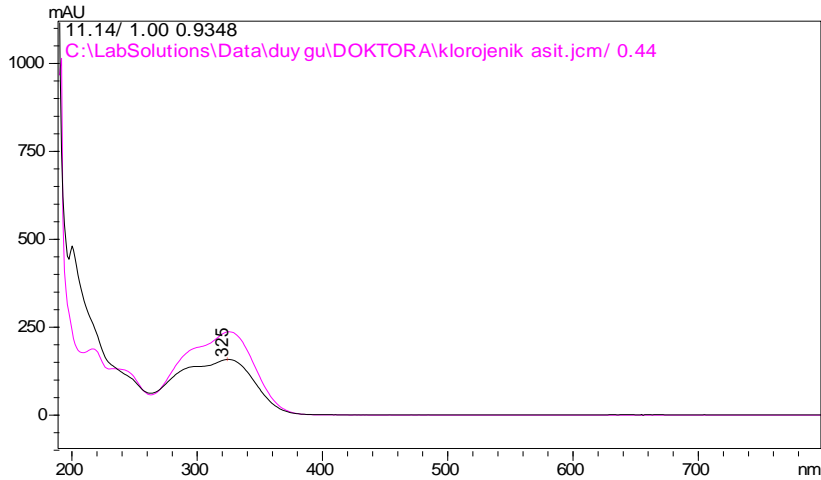
Şekil 4.50 _____:t_R: 24,214 (yaprak); _____: kersetin standartının spektrumu



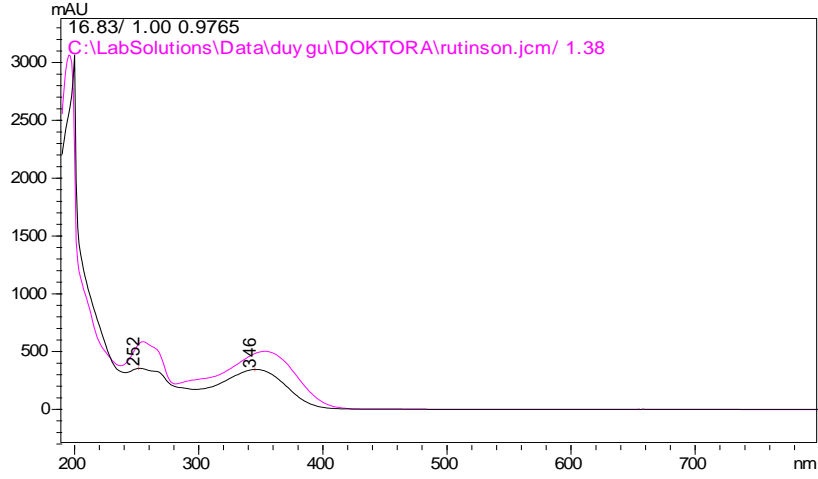
Şekil 4.51 _____:t_R: 24,214 (yaprak); _____: kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu



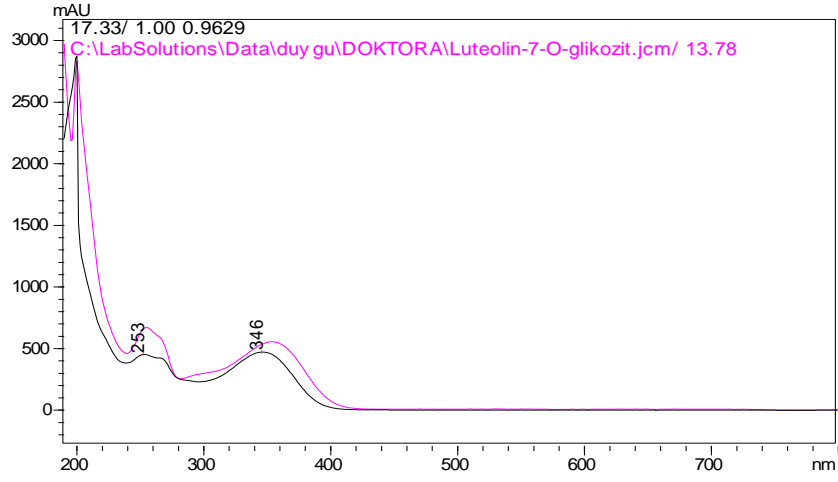
Şekil 4.52 Bitkinin çiçeğinden ASE kullanılarak hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı



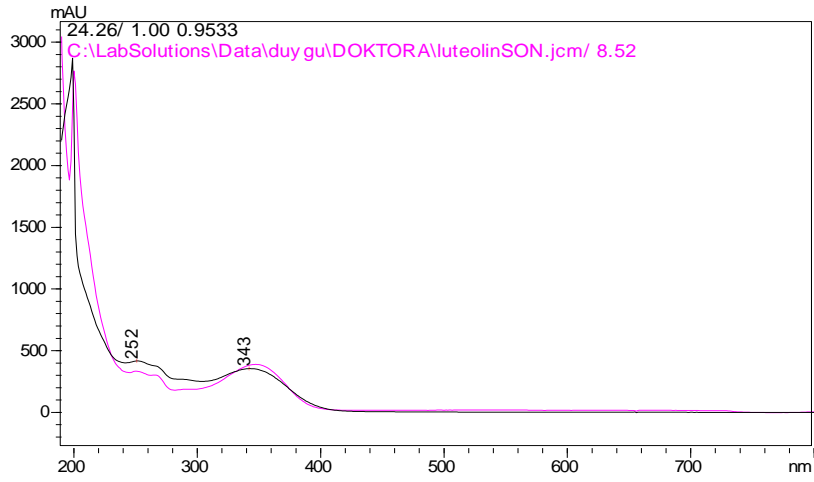
Şekil 4.53 _____:t_R: 11,138 (çiçek); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



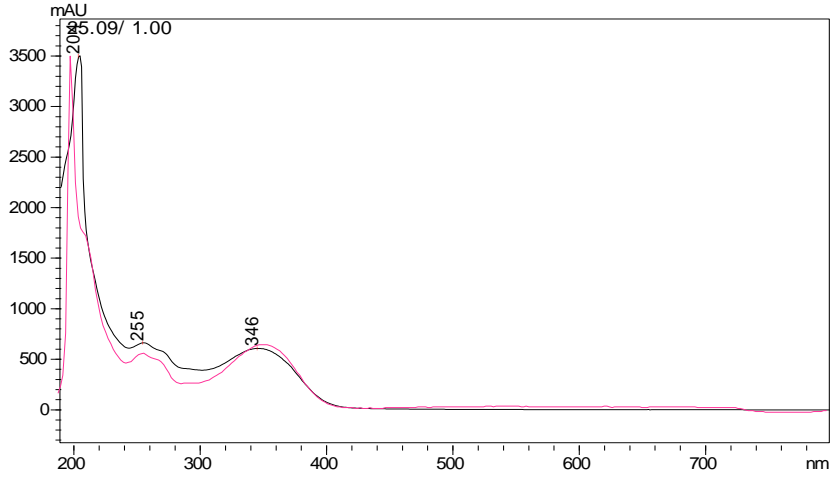
Şekil 4.54 _____:t_R: 16,831 (çiçek); _____: rutin standartının spektrumu



Şekil 4.55 _____:t_R: 17,328 (çiçek); _____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu



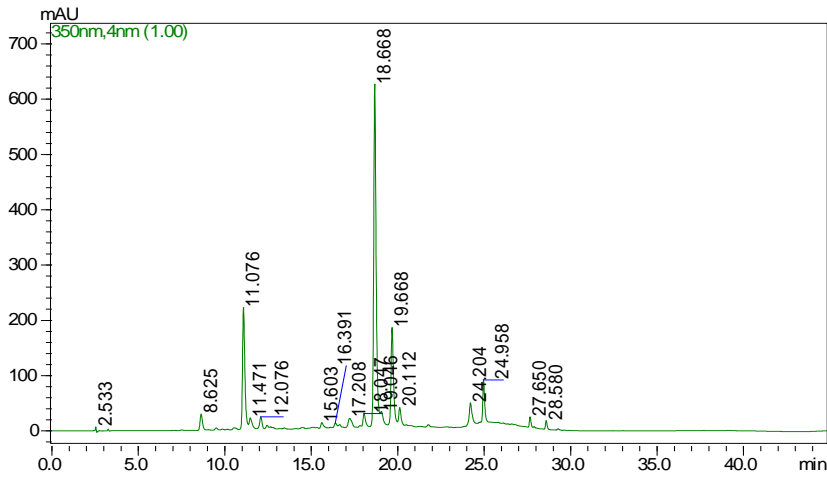
Şekil 4.56 _____:t_R: 24,263 (çiçek); _____: luteolin standartının spektrumu



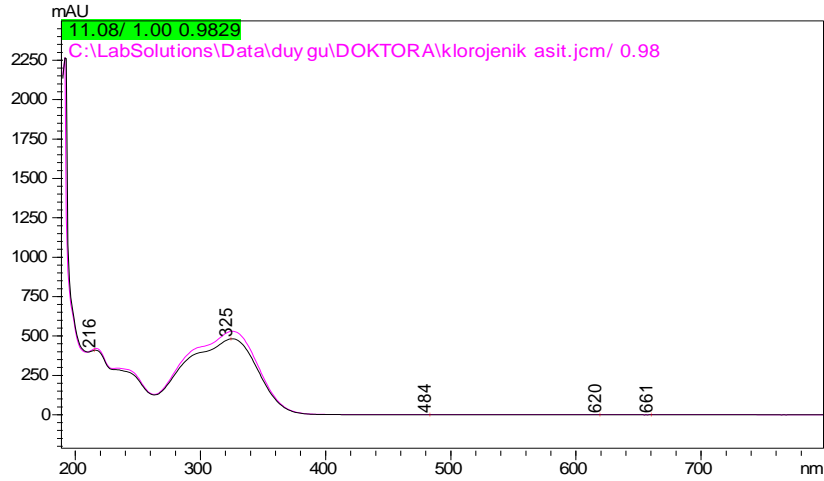
Şekil 4.57 _____: t_R: 25,093 (çiçek); _____: kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu

4.2.5 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından maserasyon yöntemiyle hazırlanan etanol ekstralarının HPLC sonuçları

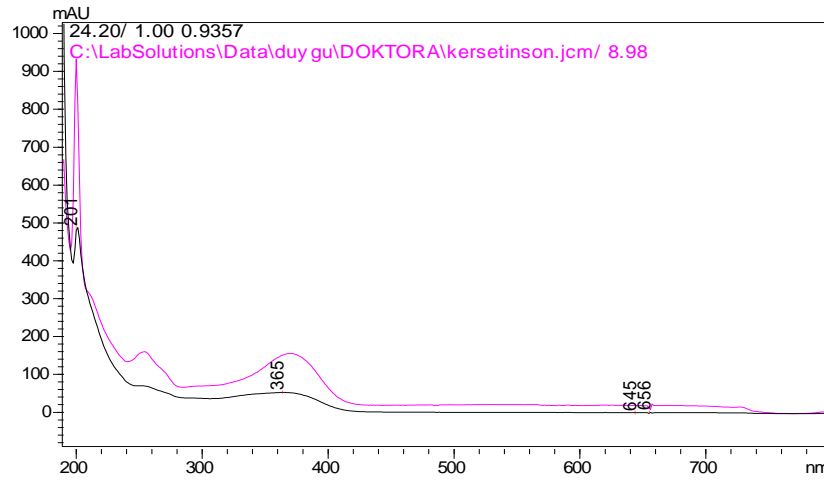
Bitkinin öğütülmüş çiçek, yaprak ve gövde kısımları etanol ile üçer hafta boyunca çözücüleri renksiz hale gelinceye kadar maserasyona bırakıldı. Elde edilen ekstraların çözücüleri süzildükten sonra evaporatörde uçuruldu ve kalıntı metanol/su (2:1) çözeltisinde çözüldü ve 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edildi. Bitkinin sırasıyla yaprak, çiçek ve gövde kısımlarının etanol ekstralarının kromatogramları ve bu kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar ile standart maddelerin spektrumlarının karşılaştırılması aşağıdaki Şekil 4.58-4.69'da verilmiştir.



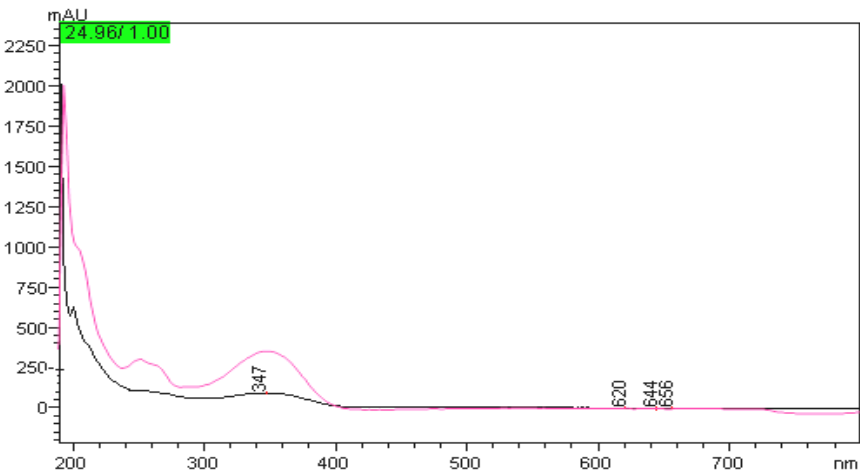
Şekil 4.58 Bitkinin yaprağından maserasyon yöntemiyle hazırlanan EtOH ekstrasının kromatogramı



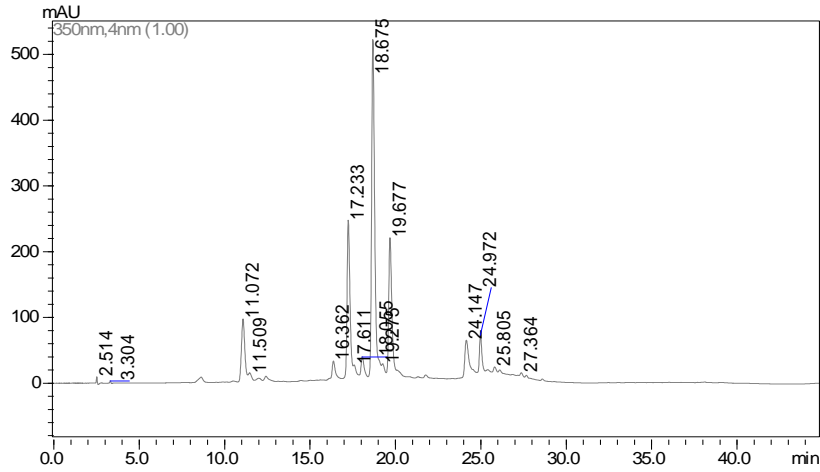
Şekil 4.59 _____:t_R: 11,076 (yaprak); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



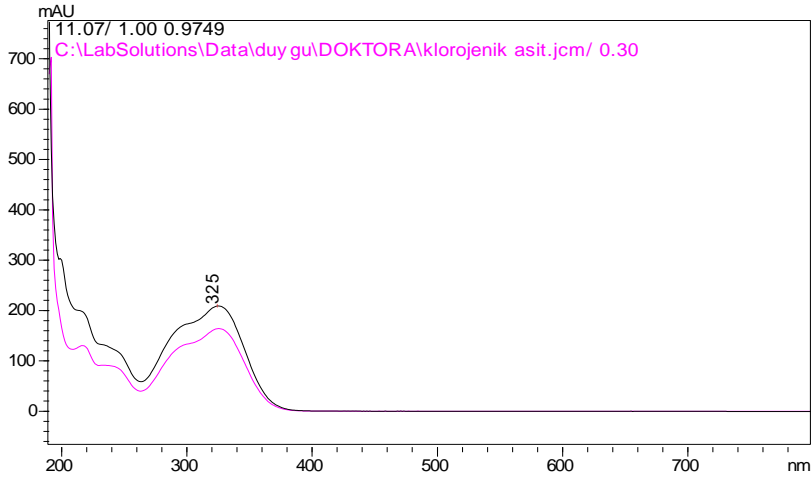
Şekil 4.60 _____:t_R: 24,204 (yaprak); _____: kersetin standartının spektrumu



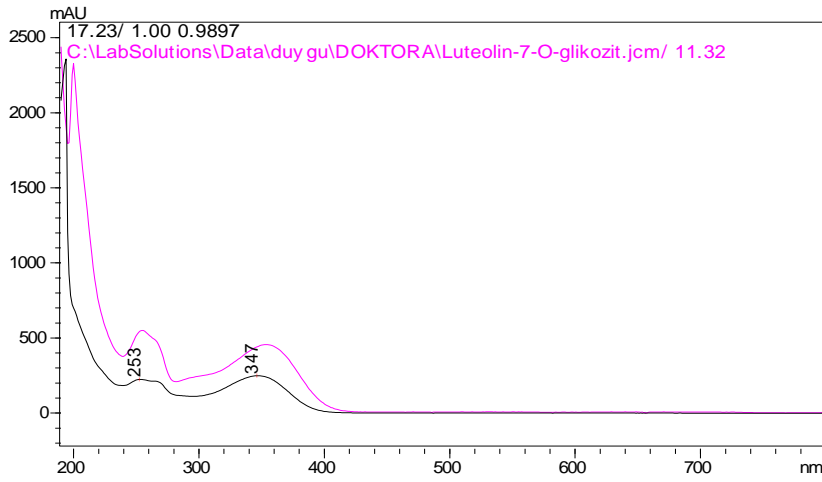
Şekil 4.61 _____:t_R: 24,958 (yaprak); _____: kersetetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu



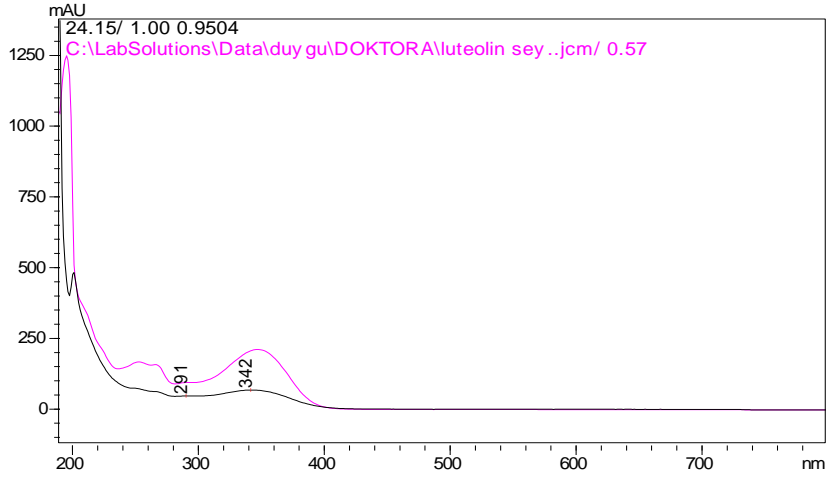
Şekil 4.62 Bitkinin çiçeğinden maserasyon yöntemiyle hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı



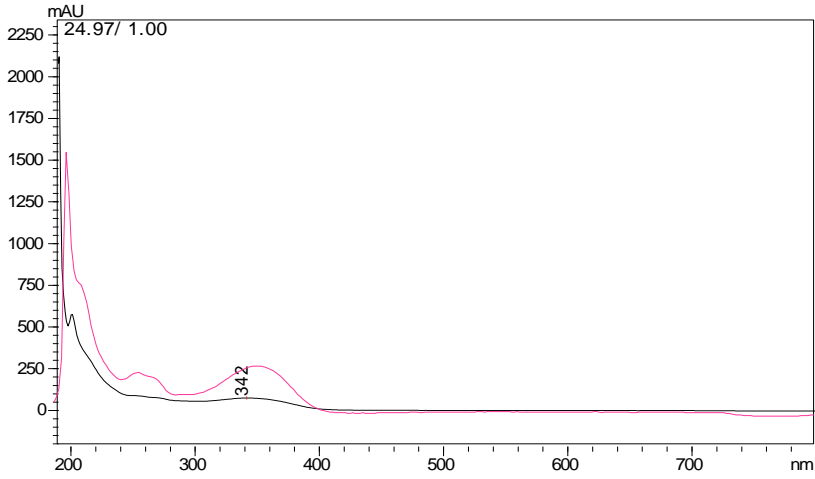
Şekil 4.63 _____:t_R: 11,072 (çiçek); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



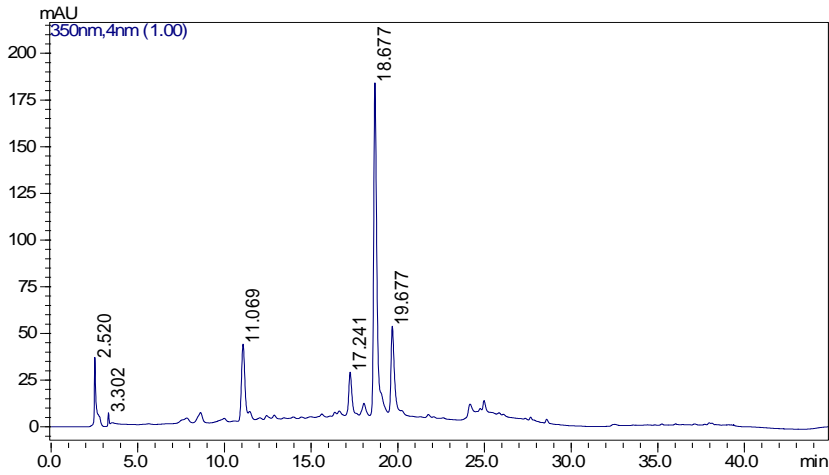
Şekil 4.64 _____:t_R: 17,233 (çiçek); _____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu



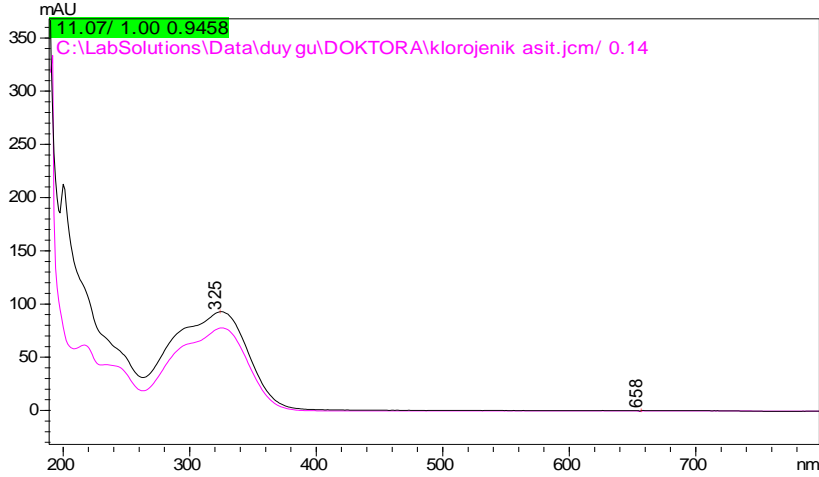
Şekil 4.65 _____:t_R: 24,147 (çiçek); _____:luteolin standartının spektrumu



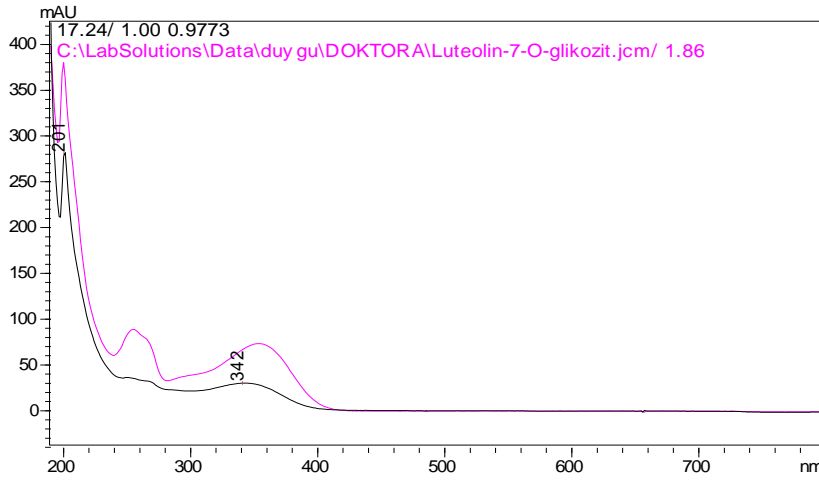
Şekil 4.66 _____:t_R: 24,972 (çiçek); _____:kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu



Şekil 4.67 Bitkinin gövdesinden maserasyon yöntemiyle hazırlanan EtOH ekstresinin kromatogramı



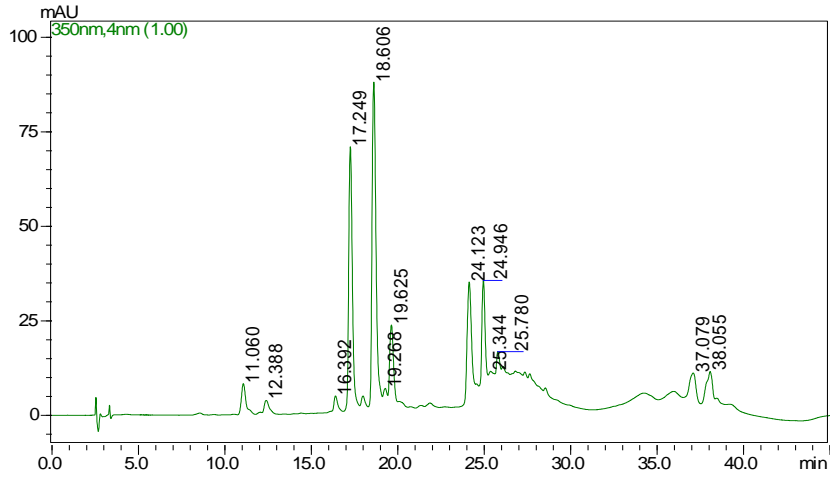
Şekil 4.68 _____:t_R: 11,069 (gövde); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



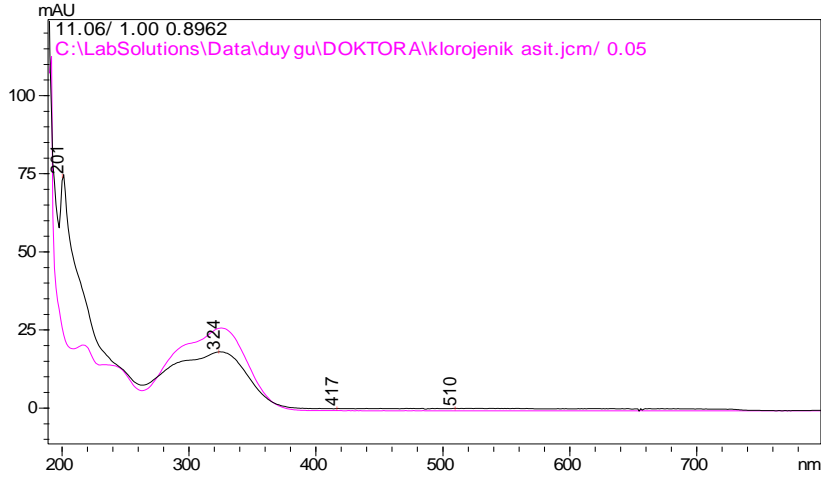
Şekil 4.69 _____:t_R: 17,241 (gövde); _____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu

4.2.6 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından soxhlet ile hazırlanan aseton ekstralarının HPLC sonuçları

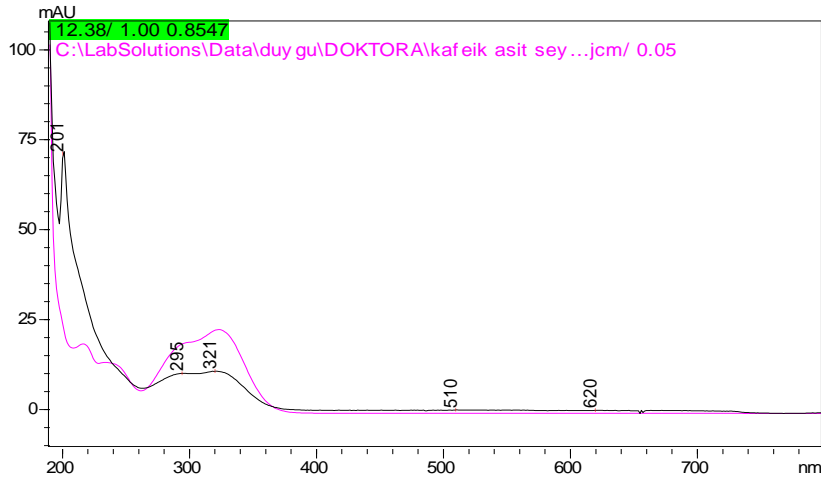
Bitkinin öğütülmüş çiçek, yaprak ve gövdesinin 1'er gramlık kısımları tartıldı, aseton ile soxhlet aparatı kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraların çözücüleri evaporatörde uçuruldu ve ekstralar metanol/su (2:1) çözeltisinde çözüldü, 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu mikro filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edildi. Bitkinin sırasıyla çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlanan aseton ekstralarının kromatogramları ve bu kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar ile standart maddelerin spektrumlarının karşılaştırılması aşağıdaki Şekil 4.70-4.80'de verilmiştir.



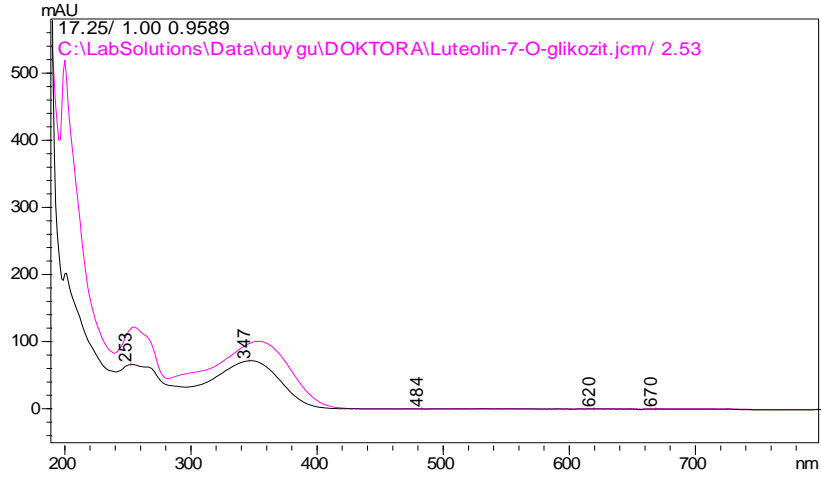
Şekil 4.70 Bitkinin çiçeğinden soxhlet kullanılarak hazırlanan aseton ekstresinin kromatogramı



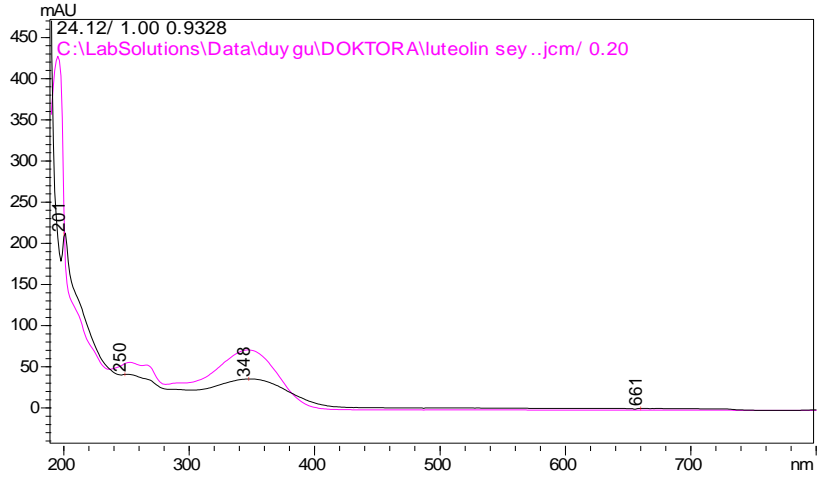
Şekil 4.71 _____:t_R: 11,060 (çiçek); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



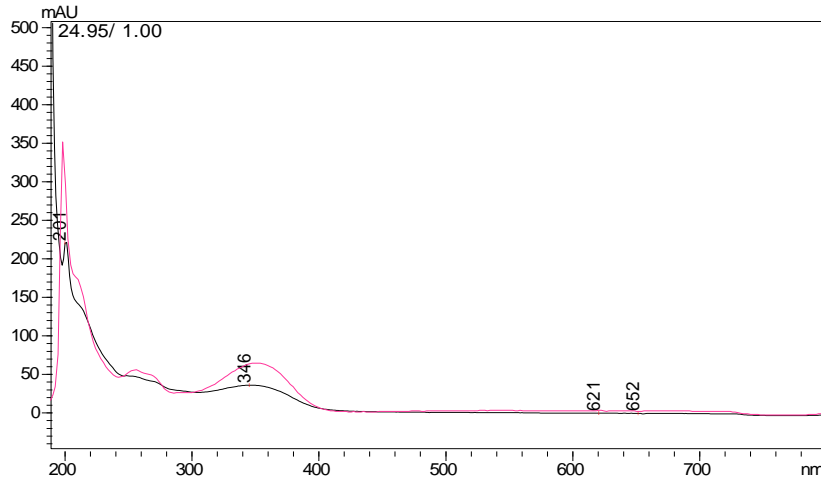
Şekil 4.72 _____:t_R: 12,388 (çiçek); _____: kafeik asit standartının spektrumu



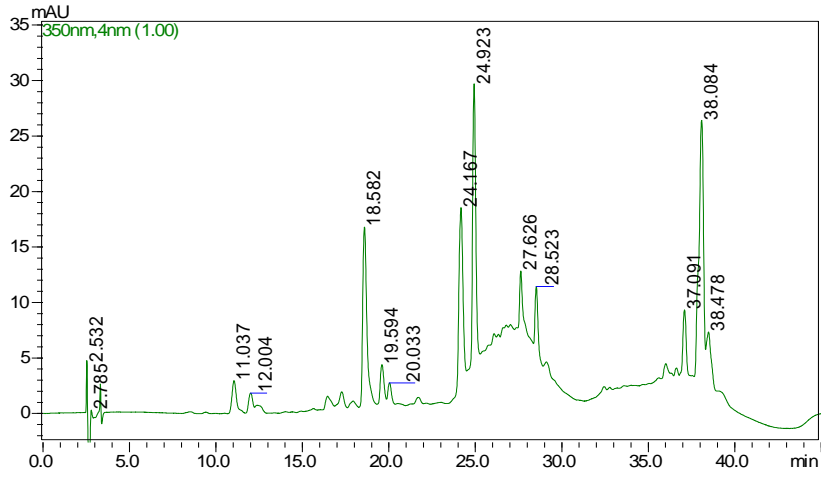
Şekil 4.73 _____:t_R:17,249 (çiçek); _____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu



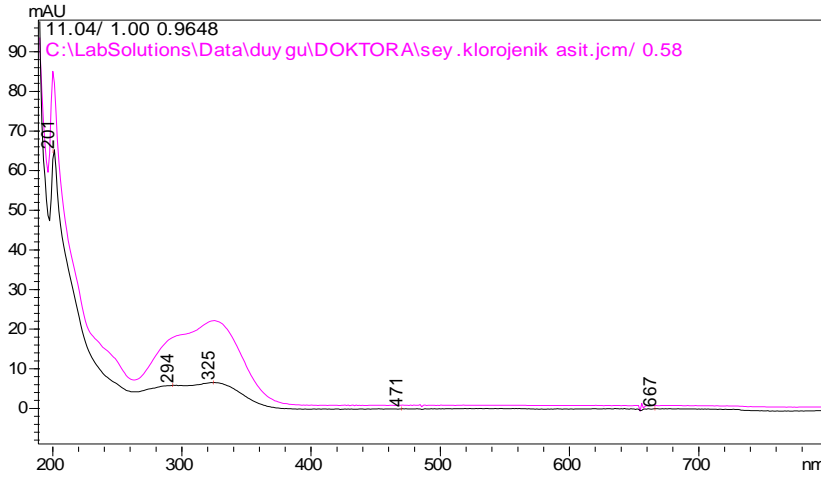
Şekil 4.74 _____:t_R:24,123 (çiçek); _____:luteolin standartının spektrumu



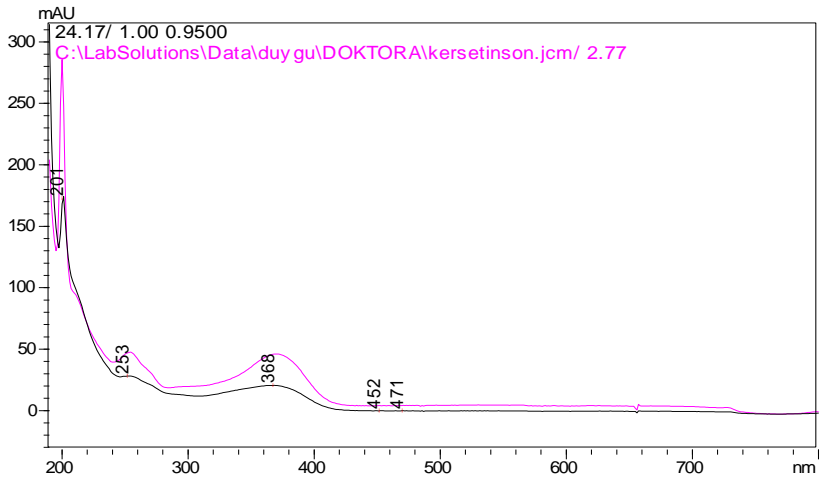
Şekil 4.75 _____:t_R:24,946 (çiçek); _____:kersetageetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu



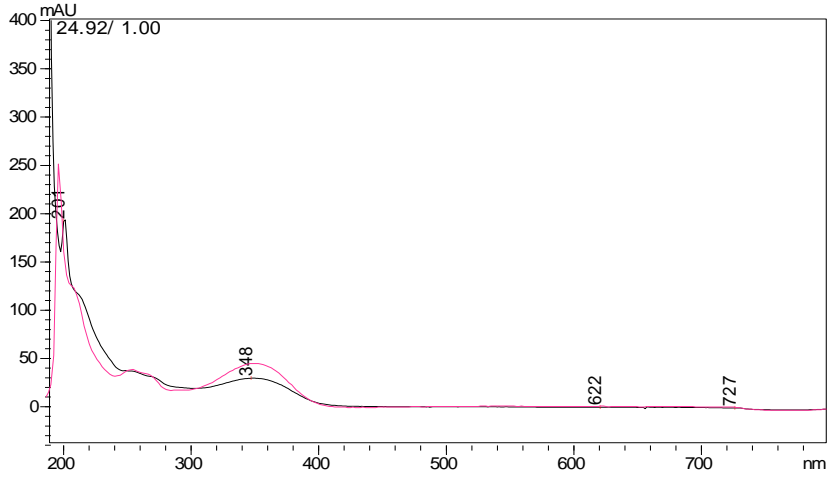
Şekil 4.76 Bitkinin yaprağından soxhlet kullanılarak hazırlanan aseton ekstresinin kromatogramı



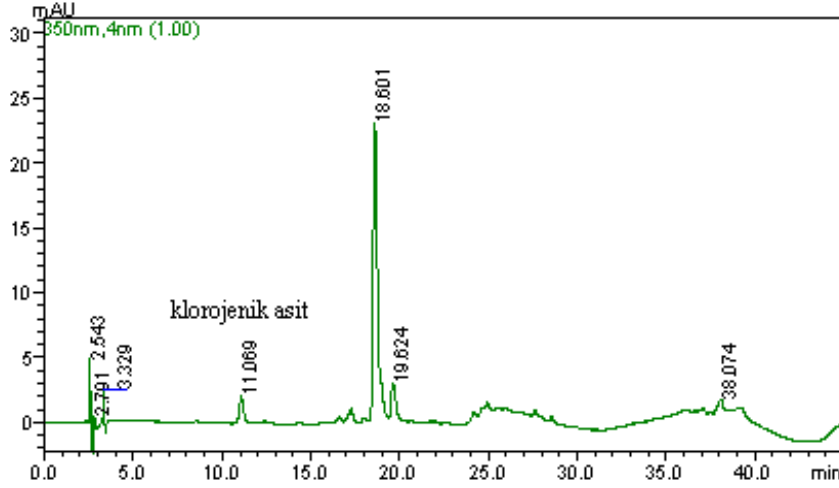
Şekil 4.77 _____: t_R : 11,037 (yaprak); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



Şekil 4.78 _____: t_R : 24,167 (yaprak); _____: kersetin standartının spektrumu



Şekil 4.79 _____:t_R: 24,923 (yaprak); _____:kersetagetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu

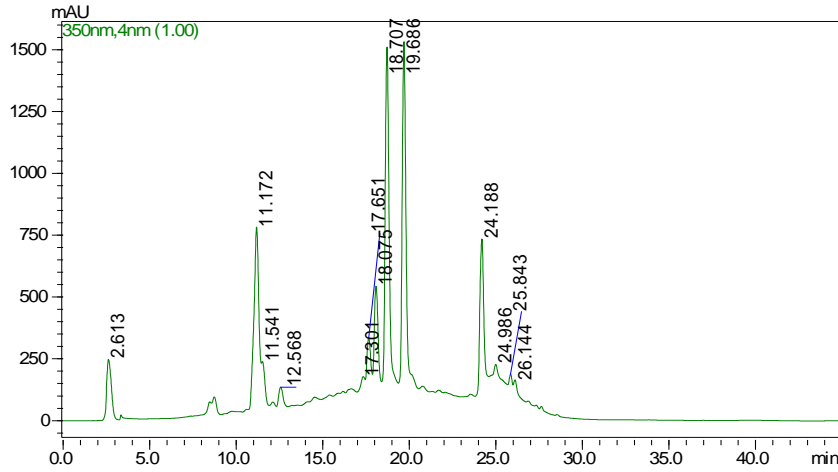


Şekil 4.80 Bitkinin gövdesinden soxhlet kullanılarak hazırlanan aseton ekstresinin kromatogramı

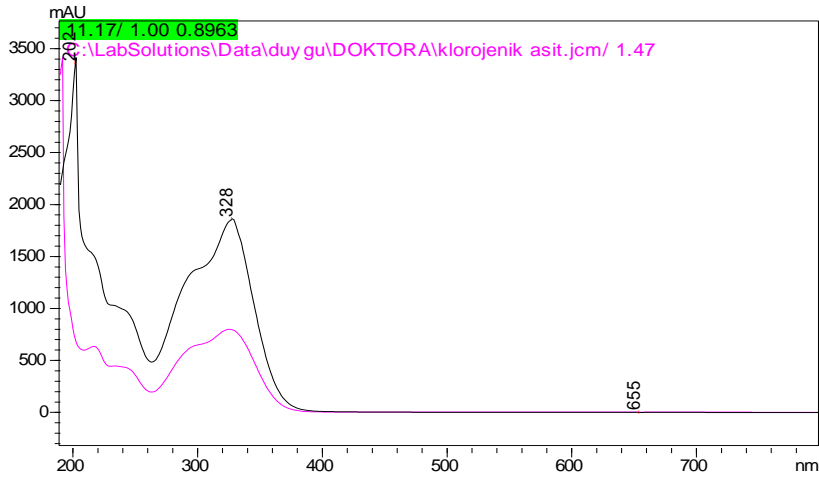
4.2.7 A. *grandifolia* bitkisinin hidrolizi ve HPLC sonuçları

Bitkinin çiçek, yaprak ve gövdesinin 1'er gramlık kısımları tartıldı ve bu kısımları 0,1 M 100 mL HCl ile hem oda sıcaklığında hem de 60 °C de 30 dk boyunca ekstrakte edildi. Aynı işlemler 1,2 M HCl ile de yapıldı. Ayrıca bitki metanollü ortamda da hidroliz edildi; bunun için 1'er gramlık bitkinin farklı kısımları son derişimi % 95 metanol 1,2 M HCl olacak şekilde oda sıcaklığında ve 60 °C'de 30 dk boyunca ekstrakte edildi. Elde edilen hidrolizatlar su buharında kapsülde uçuruldu. Geriye kalan kalıntı metanol/su (2:1) çözeltisinde çözüldü ve 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edildi.

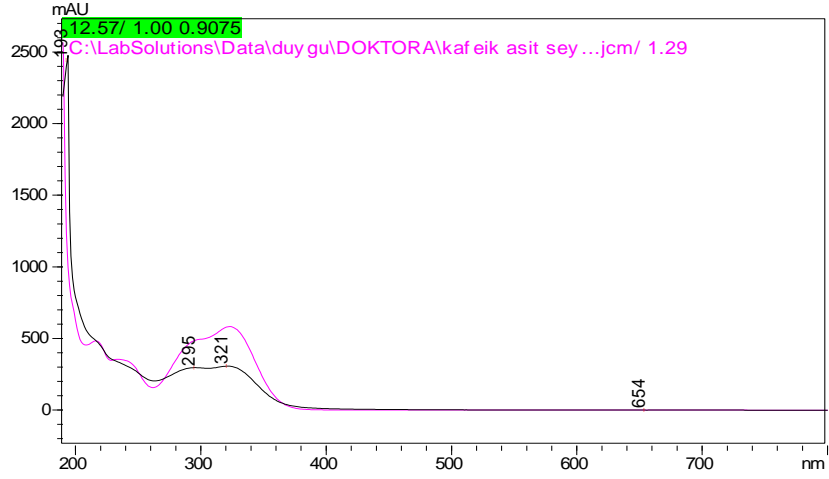
0,1 M ve 1,2 M HCl ile hidroliz edilmiş bitkinin farklı kısımlarından hazırlanan ekstraktların HPLC ile yapılan analizi sonucu elde edilen kromatogramları ve bu kromatogramlardaki piklere ait spektrumlar ile standart maddelerin spektrumlarının karşılaştırılması aşağıdaki şekillerde verilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bitkinin farklı kısımlarından elde edilen hidrolizatlarda 8,73. ve 6,33. dk'larda iki pik tespit edilmiş fakat yapıları belirlenememiştir. 8,73. dk'da gelen pikin bir fenolik asit türevi olduğu düşünülmektedir.



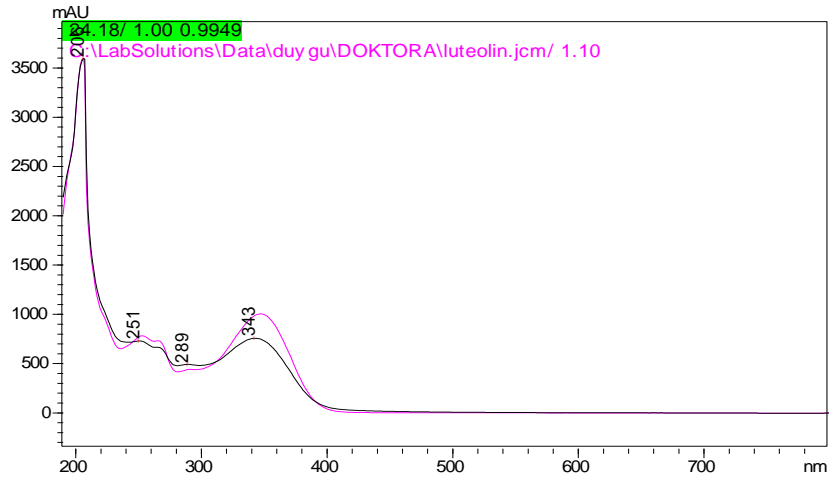
Şekil 4.81 0,1 M HCl (60 °C) ile bitkinin çiçek kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı



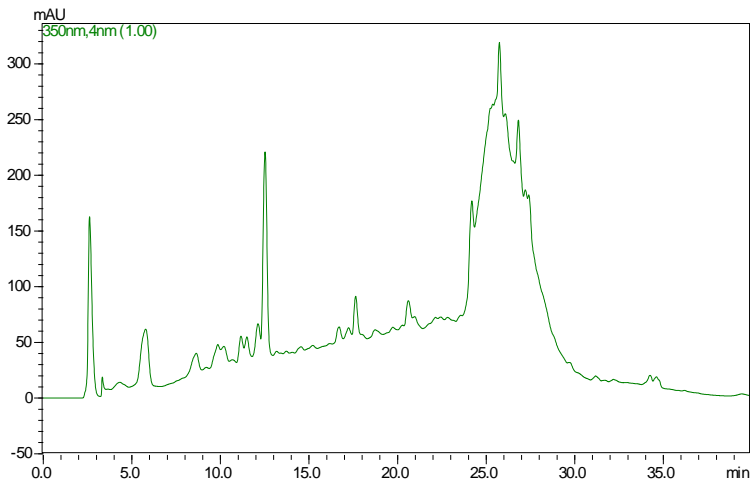
Şekil 4.82 _____: t_R : 11,172 (çiçek); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



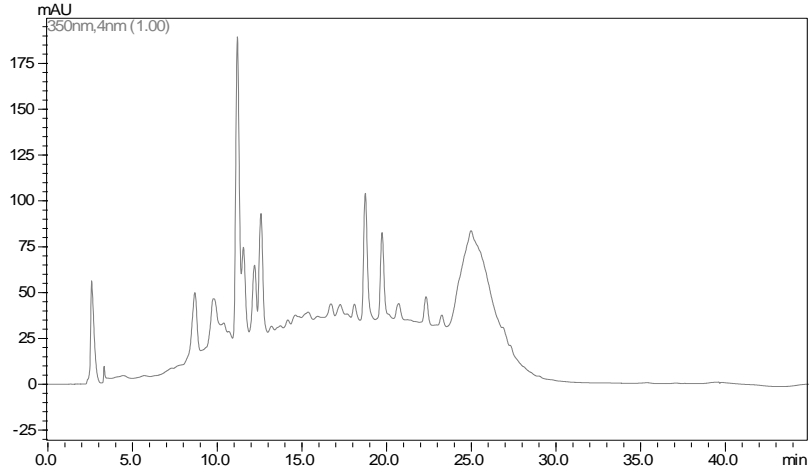
Şekil 4.83 _____:t_R: 12,568 (çiçek); _____: kafeik asit standartının spektrumu



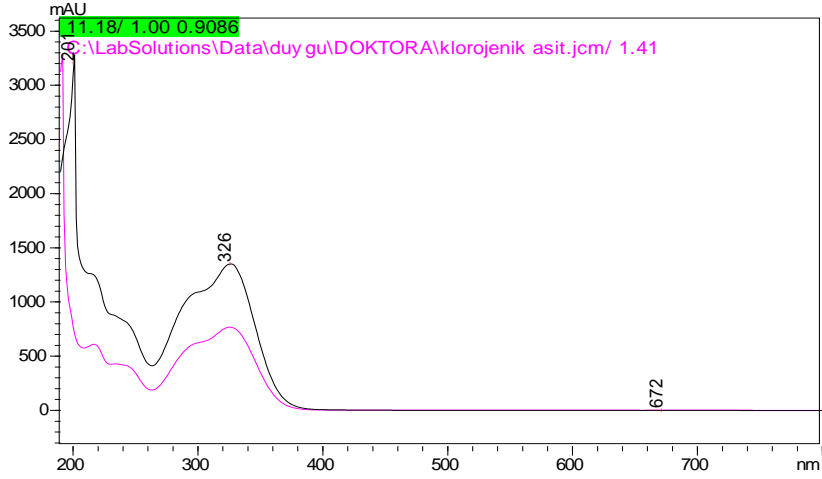
Şekil 4.84 _____:t_R:24,188 (çiçek); _____:luteolin standartının spektrumu



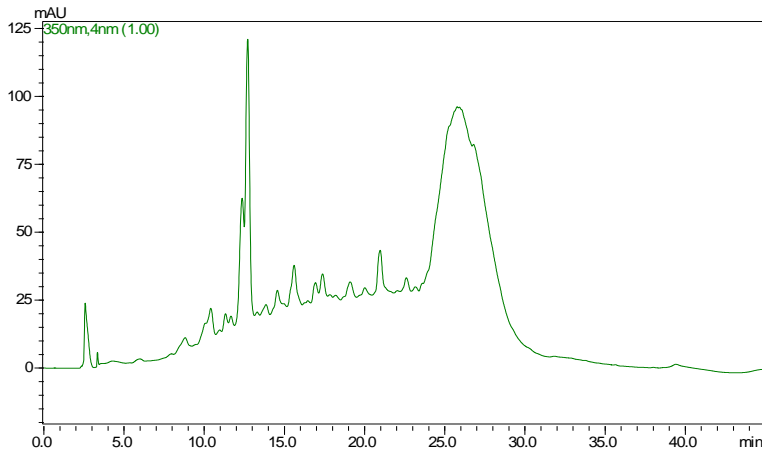
Şekil 4.85 1,2 M HCl (60 °C) ile bitkinin çiçek kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı



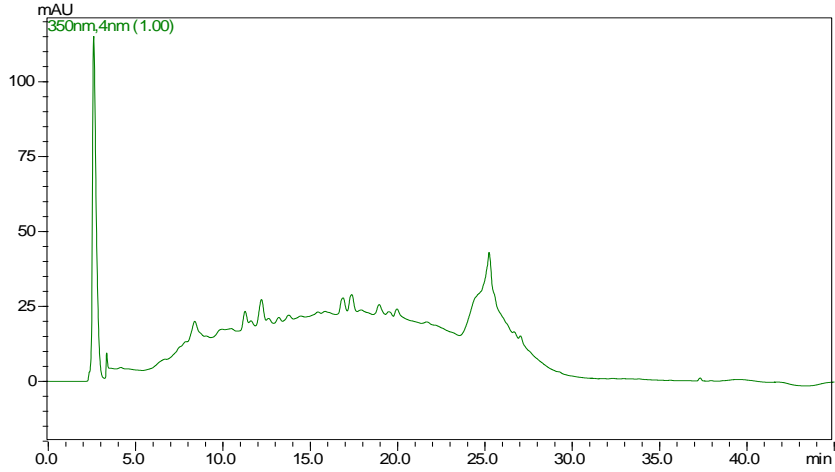
Şekil 4.86 0,1 M HCl (60 °C) ile bitkinin yaprak kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı



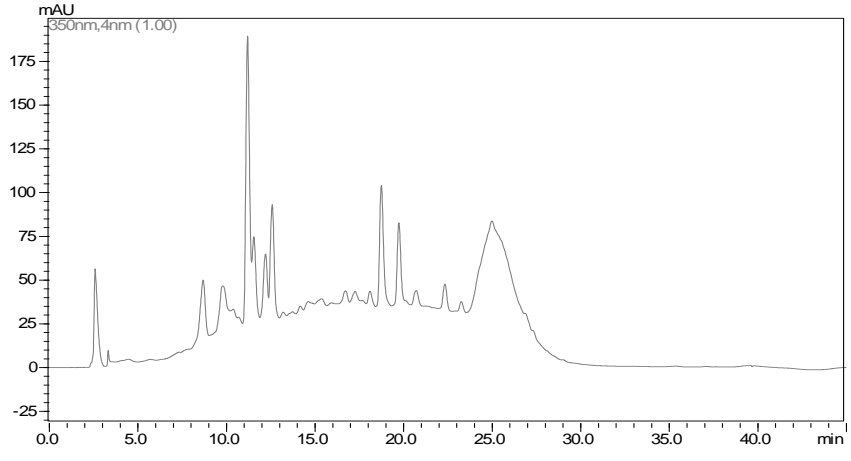
Şekil 4.87 _____: t_R : 11,180 (çiçek); _____: klorojenik asit standartının spektrumu



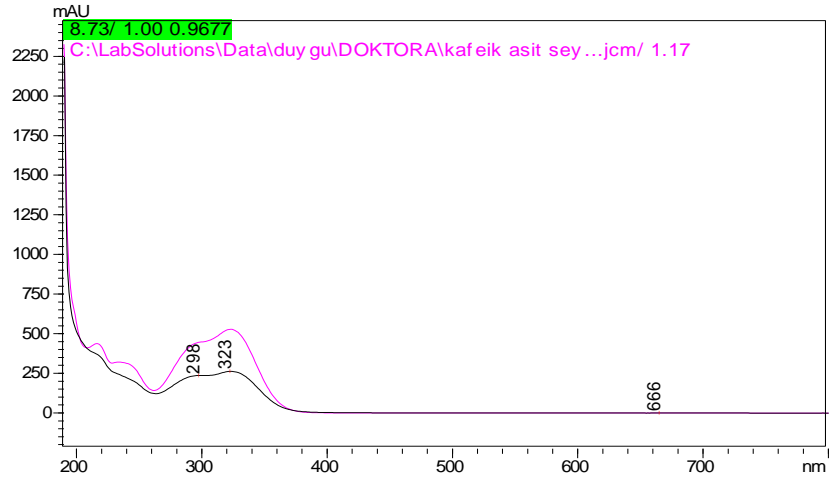
Şekil 4.88 1,2 M HCl (60 °C) ile bitkinin yaprak kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı



Şekil 4.89 0,1 M HCl (60 °C) ile bitkinin gövde kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı



Şekil 4.90 1,2 M HCl (60 °C) ile bitkinin yaprak kısmından elde edilen hidrolizatın kromatogramı



Şekil 4.91 _____:t_R: 8,73 (çiçek); _____: kafeik asit standartının spektrumu

4.3. A. *grandifolia* Bitkisinin İçerdiği Boyarmaddelerin Ekstraksiyonu İçin Gerekli Koşulların Spektrofotometrik Olarak İncelenmesi

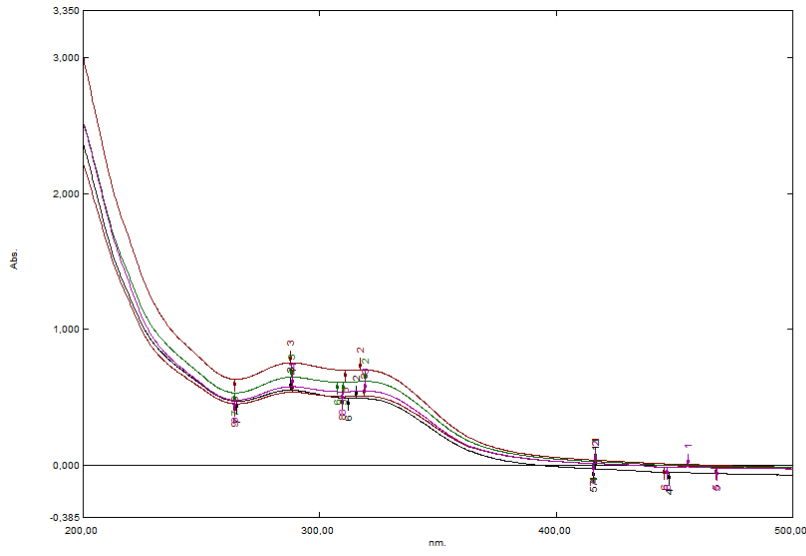
Bölüm 3.7’de anlatıldığı gibi hazırlanan tüm örneklerin spektrumları 200-500 nm aralığında alındı ve maksimum absorbandsın gerçekleştiği dalga boyu olan 319 nm’de ölçülen absorbands değerleri incelendiğinde bitkinin çiçek, yaprak ve gövdesiyle farklı sürelerde yapılan denemelerde en uygun ekstraksiyon süresinin 30 dk olduğu görüldü. Ayrıca yine 319 nm’deki absorbandslar incelendiğinde boyama banyosu için en uygun sıcaklığın 100 °C’de olduğu anlaşıldı ve böylelikle boyama banyosunun sıcaklığı ve süresi tespit edildi. 319 nm’de sıcaklık ve zamana karşı kaydedilen absorbands değerleri Tablo 4.1 ile 4.2’de ve Şekil 4.92-4.97’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Bitkinin ekstraksiyonu için gerekli sürenin belirlenmesi

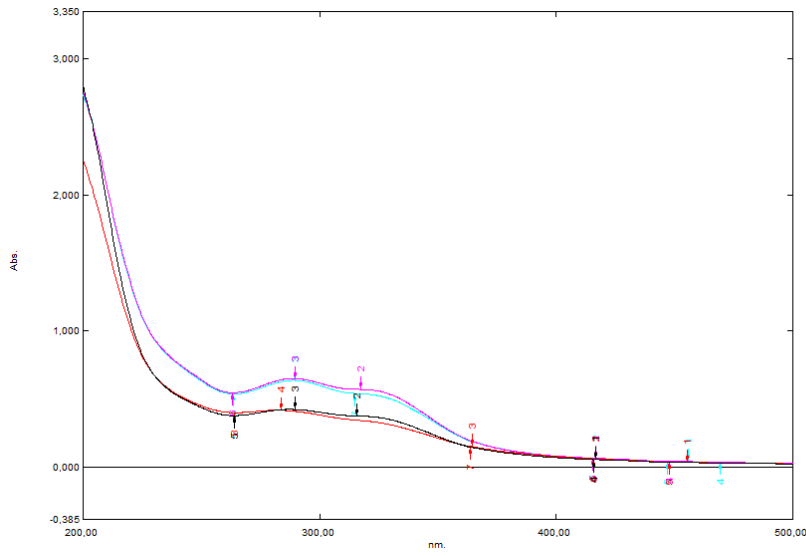
Zaman(dk)	10	15	30	45
Çiçek	0,469	0,513	0,543	0,423
Yaprak	0,617	0,509	0,692	0,491
Gövde	0,372	0,338	0,570	0,535

Tablo 4.2 Bitkinin ekstraksiyonu için uygun sıcaklığın belirlenmesi

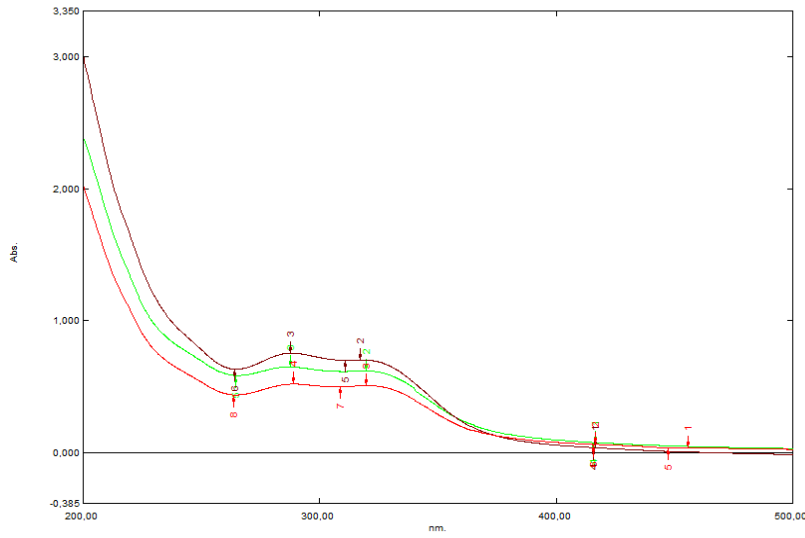
Sıcaklık (°C)	Çiçek	Yaprak	Gövde
50	0,414	0,505	0,468
75	0,374	0,617	0,479
100	0,543	0,692	0,570



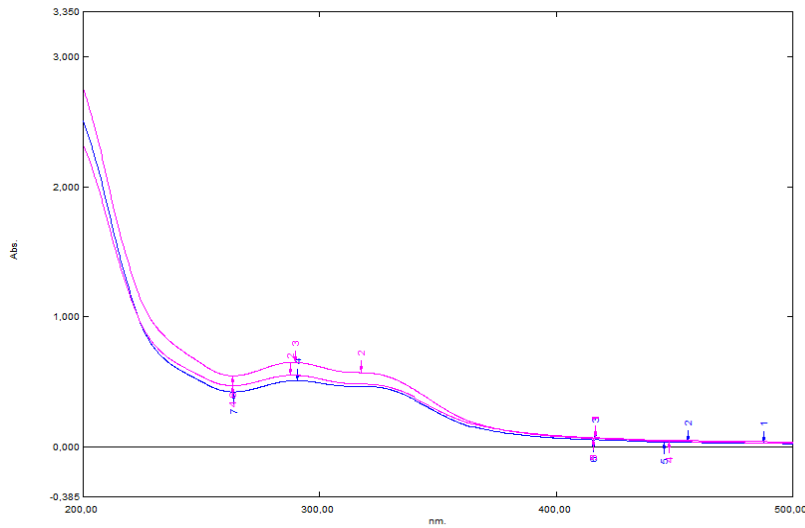
Şekil 4.92 *A. grandifolia* bitkisinin yapraklarıyla yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sürenin belirlenmesi amacıyla 5-45 dk sürelerle 100 °C'deki su banyosunda bekletilen ekstrenin spektrumu



Şekil 4.93 *A. grandifolia* bitkisinin gövdesiyle yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sürenin belirlenmesi amacıyla 5-45 dk sürelerle 100 °C'deki su banyosunda bekletilen ekstrenin spektrumu



Şekil 4.96 *A. grandifolia* bitkisinin yaprak kısmıyla yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 50-100 °C'deki su banyosunda 30 dk bekletilen ekstrenin spektrumu



Şekil 4.97 *A. grandifolia* bitkisinin gövde kısmıyla yapılan ekstraksiyon işlemi için en uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 50-100 °C'deki su banyosunda 30 dk bekletilen ekstrenin spektrumu

4.3.1 *A. grandifolia* bitkisi ile direkt doğal yün boyama işlemi

Bölüm 3.7'de anlatıldığı üzere spektrofotometrik olarak koşulları belirlenen boyama banyosunda doğal yün boyama işlemi gerçekleştirildi. Bunun için 1,0 g yün tartıldı ve üzerine bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından 2,0 g ilave edilerek 100 °C'deki su banyosunda 30 dk boyunca ara sıra karıştırılarak boyama yapıldı. Boyanmış yünler iyice yıkanarak gölgede kurutuldu.

4.4. Bitkiyle Boyanmış Yünden Ekstre Edilen Boyarmaddelerin HPLC İle Analizi

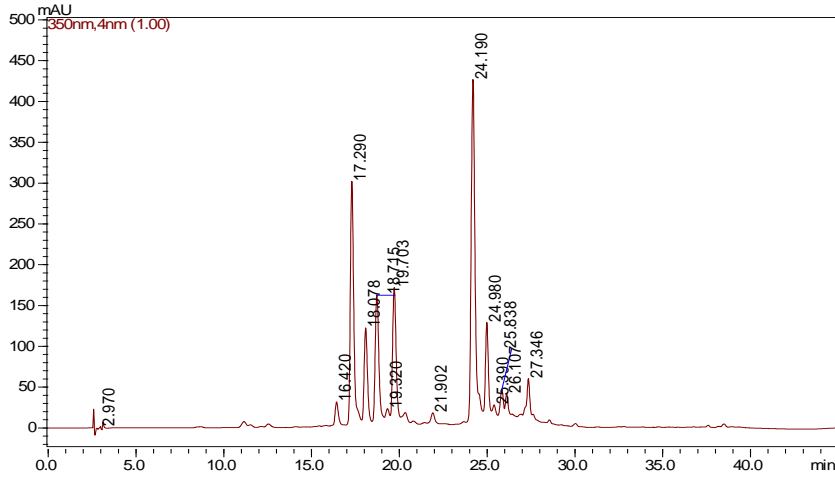
4.4.1 Boyarmaddelerin yünden ekstre edilebilmesi için gerekli zamanın kromatografik olarak belirlenmesi

Bitkinin çiçeği, yaprağı ve gövdesiyle boyanmış yün örneklerinden 0,2 g tartıldı ve ağzı kapaklı bir deney tüpüne alındı, üzerine 2 mL dimetilformamid (DMF) eklenip 1 dakika vortekste karıştırıldı ve 100 °C'deki su banyosunda 5, 15 ve 30 dk boyunca ekstrakte edildi. Daha sonra ekstratlar soğutuldu ve 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu filtreden geçirilerek 20 µL'leri HPLC'ye enjekte edildi. 5 dk sonucunda elde edilen DMF ekstresinin HPLC analizi incelendiğinde tanımlanabilecek miktarda bir pikin olmadığı görüldü ve bunun üzerine, 15 ve 30 dk süreli ekstratlar üçer kez HPLC'ye enjekte edilerek bitkinin farklı kısımlarında bulunan boyarmaddelerin bu sürelerde gösterdiği pik alanlarının ortalamaları göz önüne alınarak bir tablo oluşturuldu. Tablo 4.3'e göre, bitkinin çiçek ve gövde kısımları için en uygun boyarmadde ekstraksiyon süresinin 15 dakika; yaprak kısmı için ise 30 dakika olduğu belirlendi. Bu ekstraksiyon süreleri göz önüne alınarak bitkide bulunan boyarmaddeler HPLC ile tanımlandı ve daha sonra boyarmaddelerin kantitatif analizleri yapıldı.

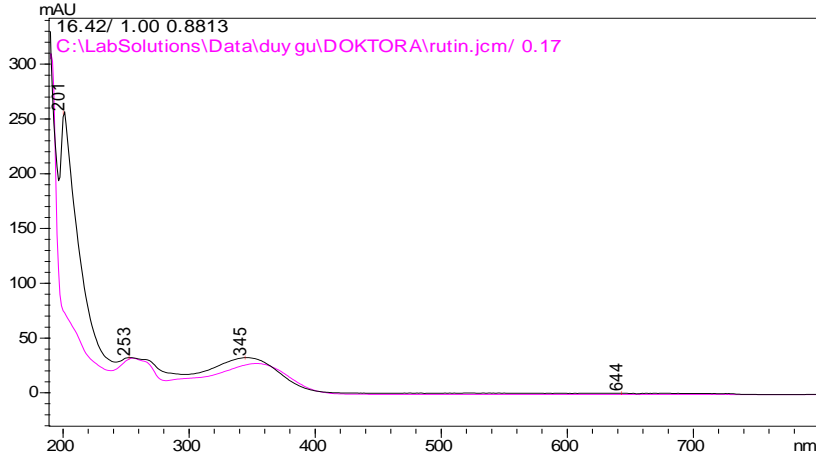
Tablo 4.3 Bitkide bulunan boyarmaddelerin yün üzerinden ekstraksiyonu için gerekli sürenin belirlenmesi

Boyarmaddeler	Çiçek (\bar{A})		Yaprak (\bar{A})		Gövde(\bar{A})	
	15 dk	30 dk	15 dk	30 dk	15 dk	30dk
Rutin	335991	310909	65040	74814		
Luteolin-7-O-glikozit	4346666	4023432	224481	241638	87112	86529
Luteolin	7345191	6389455				
Kersetin			1250520	1276682		
Kafeik asit			160039	172602		
Klorojenik asit			249571	697937		

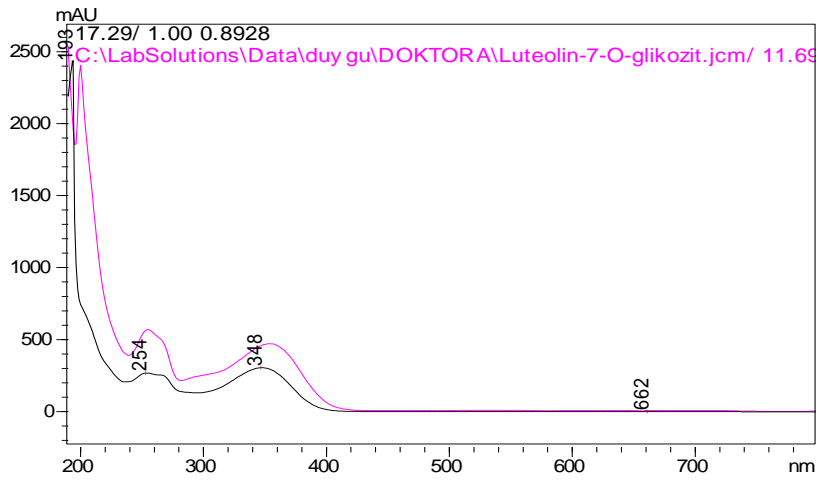
4.4.2 Boyarmaddelerin HPLC ile kalitatif analizi



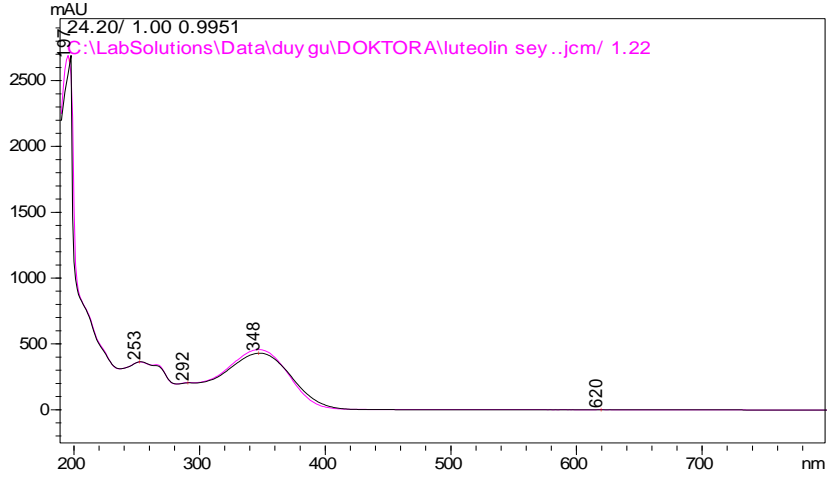
Şekil 4.98 Bitkinin çiçek kısmıyla boyanmış yünün DMF ekstresinin kromatogramı



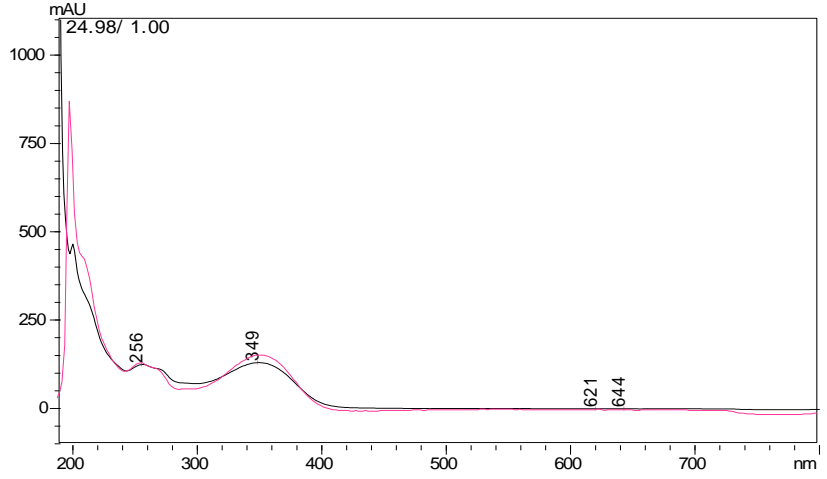
Şekil 4.99 (_____:t_R:16,420 (çiçek); _____:rutin standartının spektrumu)



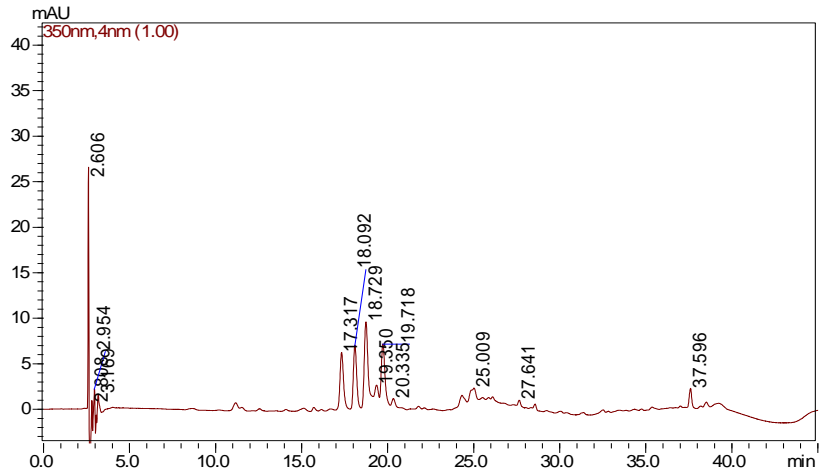
Şekil 4.100 (_____:t_R:17,290 (çiçek)_____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu)



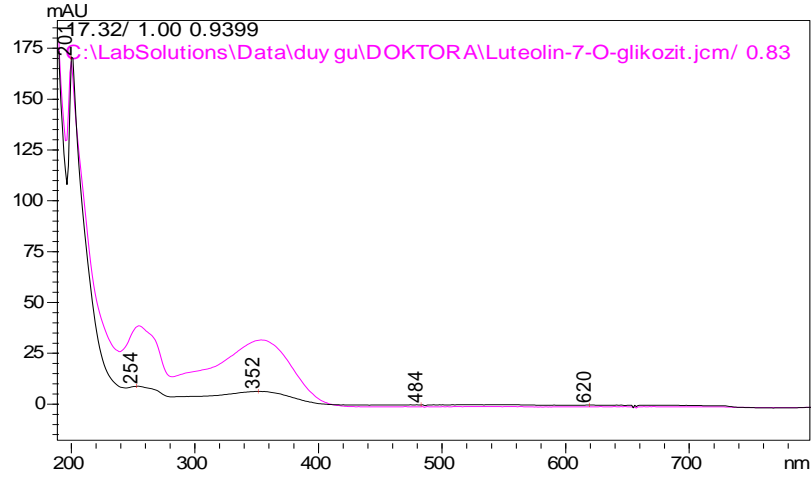
Şekil 4.101 (_____:tr:24,190 (çiçek)_____:luteolin standartının spektrumu)



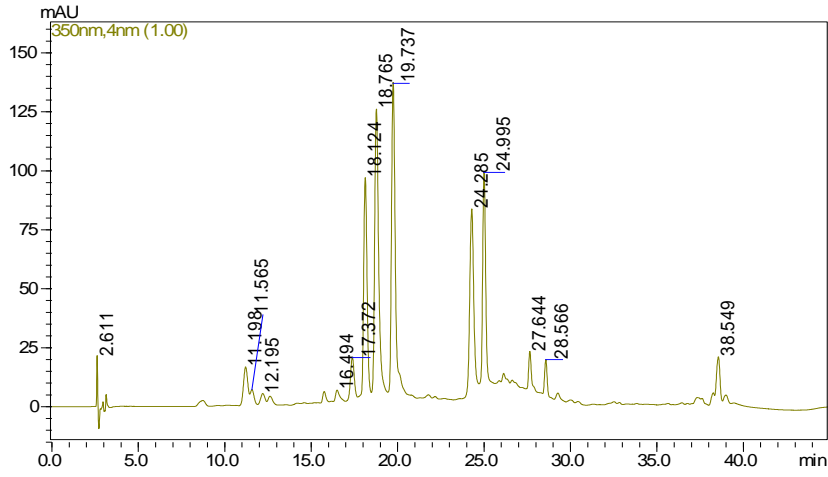
Şekil 4.102 (_____:tr:24,980 (çiçek)_____: kersetageetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu)



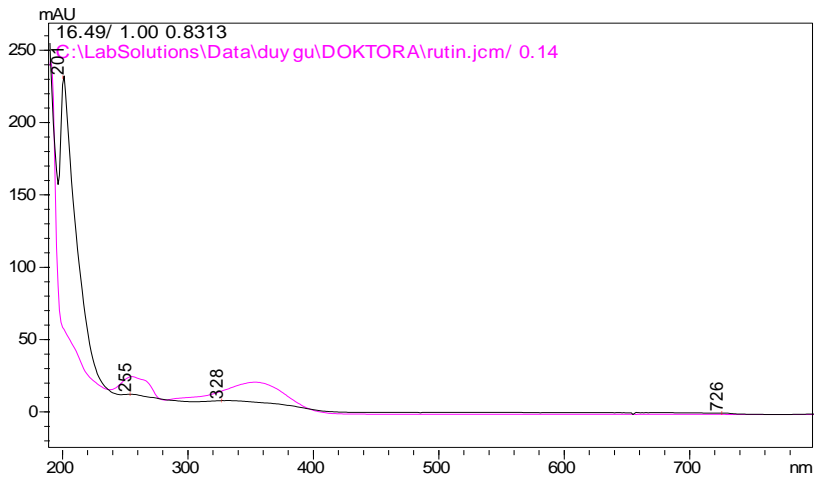
Şekil 4.103 Bitkinin gövde kısmıyla boyanmış yünün DMF ekstresinin kromatogramı



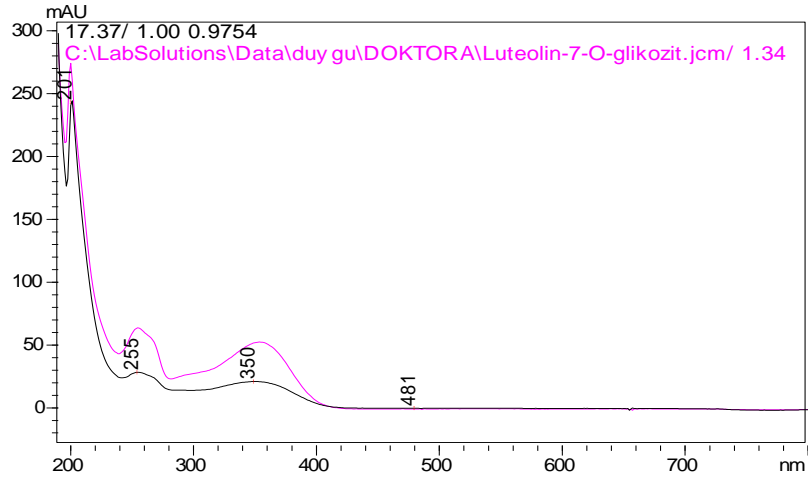
Şekil 4.104 (____:tr:17,317 (gövde)____:luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu)



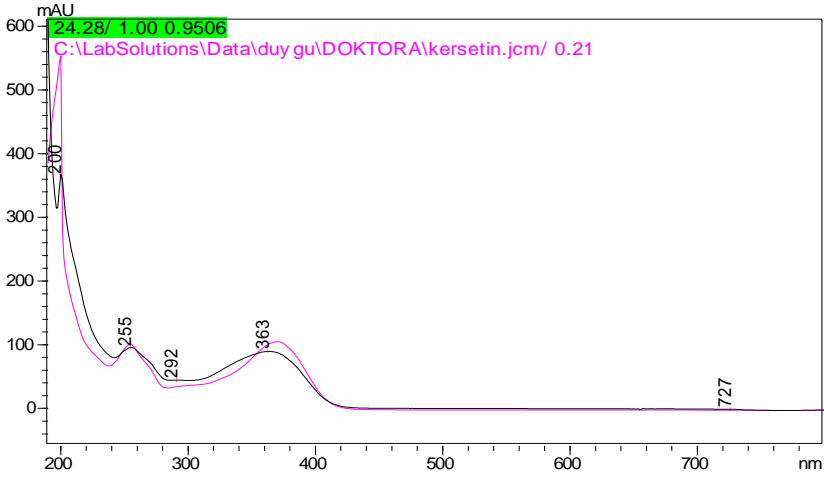
Şekil 4.105 Bitkinin yaprak kısmıyla boyanmış yünün DMF ekstresinin kromatogramı



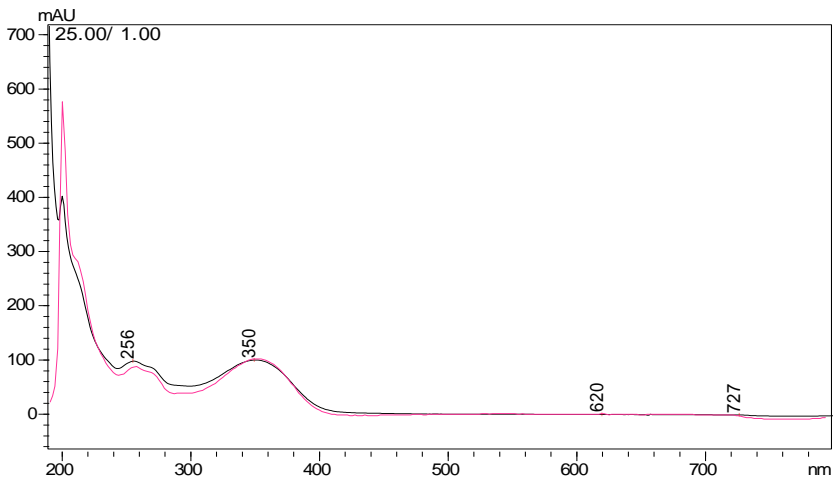
Şekil 4.106 (____:tr:16,494 (yaprak)____: rutin standartının spektrumu)



Şekil 4.107 (_____:t_R:17,372 (yaprak)_____: luteolin-7-O-glikozit standartının spektrumu)



Şekil 4.108 (_____:t_R:24,285 (yaprak)_____: kersetin standartının spektrumu)



Şekil 4.109 (_____:t_R:24,995 (yaprak)_____: kersetetin 3,6-dimetil eter standartının spektrumu)

4.4.3 Boyarmaddelerin HPLC ile Kantitatif Analizi

Bitkinin yaprağıyla boyanmış yünden 0,1960 g; çiçeğiyle boyanmış yünden 0,2291 g ve gövdesiyle boyanmış yünden 0,2108 g tartıldı ve ağzı kapalı bir deney tüpüne alındı, üzerine 2 mL dimetilformamid (DMF) eklenip 1 dakika vortekste karıştırıldı ve 100 °C'deki su banyosunda 15 dakika ve 30 dk boyunca ekstrakte edildi. Daha sonra ekstratlar soğutulduktan sonra direkt olarak 1,0/0,45 µm'lik enjektör uçlu filtreden geçirilerek 20 µL'si HPLC'ye enjekte edildi. Bitkide bulunan boyarmaddelerin miktarları Tablo 4.16'da verilmiştir.

4.4.3.1 Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması

Bitkinin çiçek, yaprak ve gövdesinde bulunan boyarmaddelerin miktarlarını belirlemek amacıyla kalitatif olarak belirlenen her bir referans maddenin belli konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını belirlemek için 5 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Standart maddelerden üçer kez enjeksiyon yapıldı ve maddelerin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunda alanlarının ortalamalarını alıp üç farklı kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu kalibrasyon eğrilerinin en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemleri hesaplandı. Her bir kalibrasyon eğrisi ve her bir enjeksiyona ait alanlar, alanların ortalamaları, standart sapmaları (SD) ve bağıl standart sapmaları (RSD) Tablo 4.4-4.15 ile Şekil 4.110-4.115'de verilmiştir.

Dedeksiyon limitinin (LOD) ve kantitatif tayin limitinin (LOQ) belirlenmesi

Referans maddelerin LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplandı.

$$\text{LOD} = 3S/N \text{ (Sinyal/Gürültü)}$$

$$\text{LOQ} = 10S/N \text{ (Sinyal/Gürültü)}$$

➤ Kafeik asit

Kafeik asitin kalibrasyon eğrisinin doğrusallığını belirlemek için 500 µg/mL konsantrasyonda 10 mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jodede MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile seyreltilerek 50 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 ve 4,0 mL alıp 5 mL'lik balon jodelere aktarıldı ve MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile hacmine tamamlandı. Standart çözeltilerin 20 µL'leri 3 kez HPLC'ye enjekte edildi. Herbir konsantrasyon değerine

karşılık gelen kafeik asitin pik alanlarının ortalama değerleri grafiğe geçirilerek kafeik asit ölçü eğrisi oluşturuldu. Tabloda pik alanları (A_1 , A_2 , A_3 ve ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma ($s/\bar{A} \times 100$) değerleri özetlenmiştir.

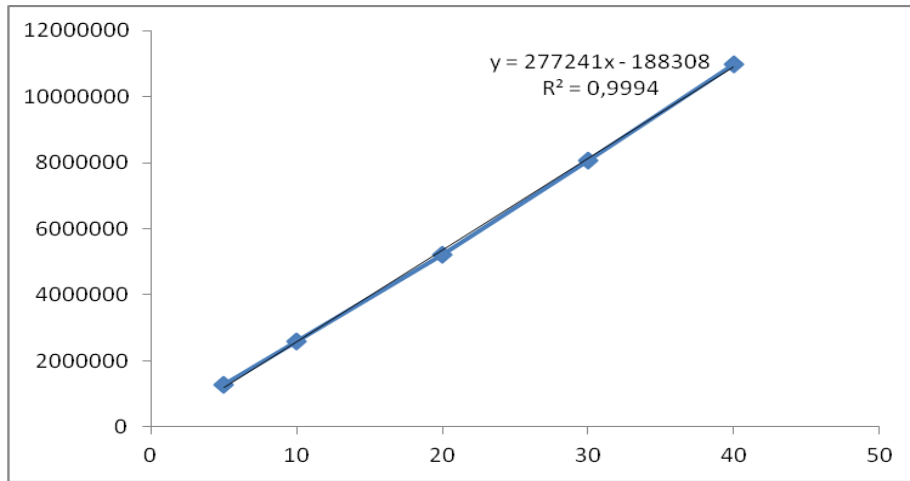
Tablo 4.4 Kafeik asitin 5,0-40 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	A_1	A_2	A_3	\bar{A}	SD	RSD
40	10925893	11058983	10991998	10992291	66545	0,60
30	7906556	8246307	8086028	8079630	169965	2,10
20	5225539	5198296	5242628	5222154	22358	0,42
10	2571438	2613763	2605060	2596754	22351	0,86
5	1283998	1274593	1275110	1277900	5287	0,41

Tablo 4.5 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	SD	RSD
a	274019	280481	277222	3231	1,16
b	171716	211709	181500	50504	26,82
R^2	0,9991	0,9992	0,9995		

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $A=277241C-188308$, korelasyon katsayısının karesi $R^2 = 0,9994$ olarak bulundu.



Şekil 4.110 Kafeik asitin 5,0-40 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Kafeik asitin dedeksiyon limiti 1,10 µg/mL, kantitatif tayin limiti 3,36 µg/mL olarak bulunmuştur.

➤ **Klorojenik asit**

Klorojenik asitin ölçü eğrisinin doğrusallığını belirlemek için 500 µg/mL konsantrasyonda 10 mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jode MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile seyreltilerek 50 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ve 3,0 mL alıp 5 mL'lik balon jolere aktarıldı ve MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile hacmine tamamlandı. Bu standart seri çözeltilerin 20 µL'leri 3 kez HPLC' ye enjekte edildi. Herbir konsantrasyon değerine karşılık gelen klorojenik asitin pik alanlarının ortalama değerleri grafiğe geçirilerek klorojenik asit ölçü eğrisi oluşturuldu. Tabloda pik alanları (A₁, A₂, A₃ ve ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma (s/ \bar{A} x100) değerleri özetlenmiştir.

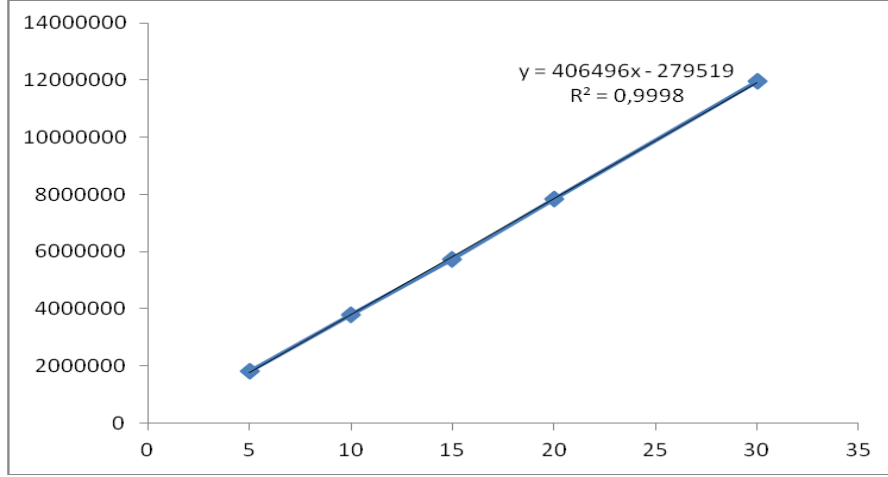
Tablo 4.6 Klorojenik asitin 5,0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Kons.(µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	SD	RSD
30	11934782	11789972	12112243	11945665	161410	1,35
20	7816429	7896746	7858318	7857164	40170	0,51
15	5659352	5796068	5746230	5733883	69189	1,20
10	3717929	3813408	3813468	3781601	55142	1,46
5	1827290	1713437	1870487	1803738	81130	4,49

Tablo 4.7 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	SD	RSD
a	406177	403033	410276	3631	0,89
b	307678	111469	284274	30813	11,02
R²	0,9995	0,9998	0,9994		

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $A = 406496 C - 279519$, korelasyon katsayısının karesi $R^2 = 0,9998$ olarak bulundu.



Şekil 4.111 Klorojenik asitin 5,0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Klorojenik asitin dedeksiyon limiti 0,46 µg/mL, kantitatif tayin limiti 1,38 µg/mL olarak bulunmuştur.

➤ **Rutin**

Rutinün ölçü eğrisinin doğrusallığını belirlemek için 500 µg/mL konsantrasyonda 10 mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözülden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jofede MeOH:H₂O (2:1,h/h) ile seyreltilerek 50 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı. Bu çözülden 0,5, 1,0, 1,5, 2,5 ve 3,0 mL alıp 5 mL'lik balon jofelere aktarıldı ve MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile hacmine tamamlandı. Bu standart seri çözümlerin 20 µL'leri 3 kez HPLC' ye enjekte edildi. Her bir konsantrasyon değerine karşılık gelen rutin pik alanlarının ortalama değerleri grafiğe geçirilerek rutinün ölçü eğrisi oluşturuldu. Tabloda pik alanları (A₁, A₂, A₃ ve ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma ($s/\bar{A} \times 100$) değerleri özetlenmiştir.

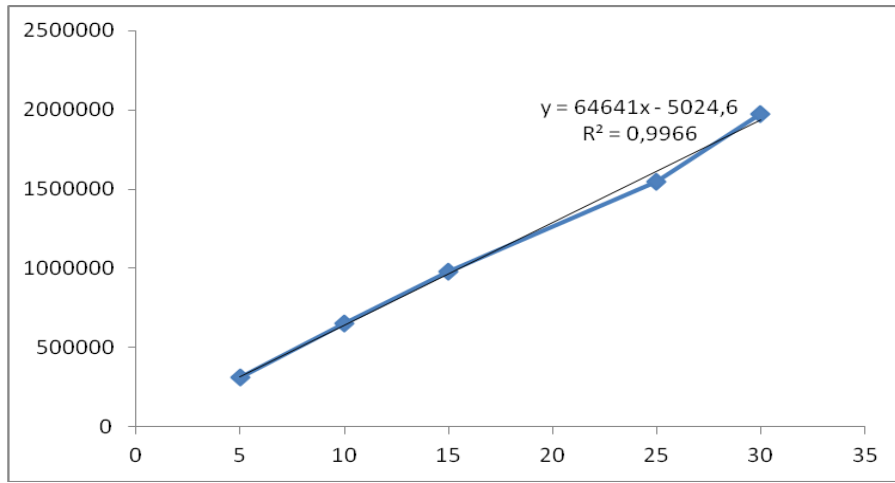
Tablo 4.8 Rutinün 5,0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Kons.(µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	SD	RSD
30	1969335	1977584	1982091	1976337	6468	0,32
25	1534046	1560321	1549127	1547831	13185	0,85
15	973976	980930	988796	981234	7414	0,75
10	643877	652030	654580	650162	5590	0,85
5	315202	315218	311012	313810	2423	0,77

Tablo 4.9 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	SD	RSD
a	64270	64843	64810	321	0,49
b	5307	5114	4653	336	6,68
R²	0,9961	0,9974	0,9962		

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $A = 64641C - 5024,6$ korelasyon katsayısının karesi $r^2 = 0,9966$ olarak bulundu.



Şekil 4.112 Rutinin 5,0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Rutinin dedeksiyon limiti 2,15 µg/mL, kantitatif tayin limiti 6,53 µg/mL olarak bulunmuştur.

➤ **Luteolin**

Luteolinin ölçü eğrisinin doğrusallığını belirlemek için 500 µg/mL konsantrasyonda 10 mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jode MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile seyreltilerek 50 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden 0,5, 1,0, 2,5 ve 4,0 mL alıp 5 mL'lik balon jolere aktarıldı ve MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile hacmine tamamlandı. Bu standart seri çözeltilerin 20 µL'leri 3 kez HPLC'ye enjekte edildi. Her bir konsantrasyon değerine karşılık gelen luteolin pik alanlarının ortalama değerleri grafiğe geçirilerek luteolinin ölçü eğrisi oluşturuldu. Tabloda pik alanları (A_1 , A_2 , A_3 ve ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma ($s/\bar{A} \times 100$) değerleri özetlenmiştir.

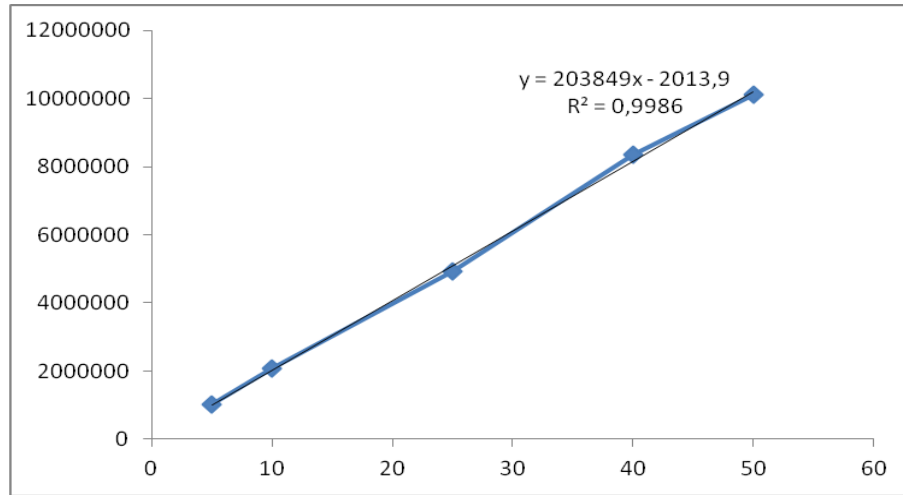
Tablo 4.10 Luteolinin 5,0-50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Kons.(µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	SD	RSD
50	10134020	10127263	10045315	10102199	49378	0,48
40	8371983	8412337	8302418	8362246	55602	0,66
25	4904420	4910044	4929752	4914739	13302	0,27
10	2075054	2068442	2086644	2076713	9213	0,44
5	1036099	1042726	1024531	1034452	9208	0,89

Tablo 4.11 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	SD	RSD
a	204463	204711	202374	1283	0,62
b	11728	10315	16000	2959	23,34
R ²	0,9986	0,9983	0,9989		

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $A=203849C-2013,9$ korelasyon katsayısının karesi $R^2 = 0,9986$ olarak bulundu.



Şekil 4.113 Luteolinin 5,0-50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Luteolinin dedeksiyon limiti 2,22 µg/mL, kantitatif tayin limiti 6,75 µg/mL olarak bulunmuştur.

➤ **Kersetin**

Kersetinin ölçü eğrisinin doğrusallığını belirlemek için 500 µg/mL konsantrasyonda 10 mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jodede MeOH:H₂O (2:1,h/h) ile seyreltilerek 50 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden 0,5, 1,5, 2,5 ve 4,0 mL alıp 5 mL'lik balon jojelere aktarıldı ve MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile hacmine tamamlandı. Bu standart seri çözeltilerin 20 µL'leri 3 kez HPLC' ye enjekte edildi. Her bir konsantrasyon değerine karşılık gelen kersetin pik alanlarının ortalama değerleri grafiğe geçirilerek kersetinin ölçü eğrisi oluşturuldu. Tabloda pik alanları (A₁,A₂, A₃ ve ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma (s/ \bar{A} x100) değerleri özetlenmiştir.

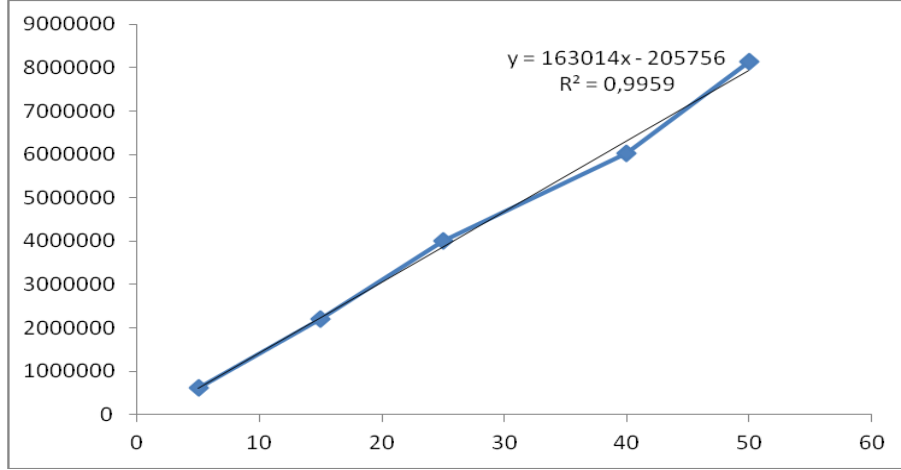
Tablo 4.12 Kersetinin 5,0-50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Kons.(µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	SD	RSD
50	8196544	8097969	8095833	8130115	57538	0,70
40	5974732	6003331	6059705	6012589	43236	0,71
25	3988429	3997980	4009658	3998689	10632	0,26
15	2215516	2190484	2210856	2205619	13312	0,60
5	638020	630948	624206	631058	6907	1,09

Tablo 4.13 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	SD	RSD
a	163603	162507	162931	552	0,33
b	214644	203540	199085	8012	3,89
R ²	0,9946	0,9961	0,9969		

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi A= 163014C-205756, korelasyon katsayısının karesi R²=0,9959 olarak bulundu.



Şekil 4.114 Kersetinin 5,0-50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Kersetinin dedeksiyon limiti 3,83 µg/mL, kantitatif tayin limiti 11,62 µg/mL olarak bulunmuştur.

➤ **Luteolin-7-O-glikozit**

Luteolin-7-O-glikozit ölçü eğrisinin doğrusallığını belirlemek için 500 µg/mL konsantrasyonda 10 mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözültiden 2 mL alınarak 10 mL'lik balon jode MeOH:H₂O (2:1,h/h) ile seyreltilerek 100 µg/mL'lik standart çözültisi hazırlandı. Bu çözültiden 0,5, 1,0, 1,5, 2,5 ve 3,75 mL alıp 5 mL'lik balon jolere aktarıldı ve MeOH:H₂O (2:1, h/h) ile hacmine tamamlandı. Bu standart seri çözültilerin 20 µL'leri 3 kez HPLC' ye enjekte edildi. Her bir konsantrasyon değerine karşılık gelen luteolin-7-O-glikozit pik alanlarının ortalama değerleri grafiğe geçirilerek luteolin-7-O-glikozitin ölçü eğrisi oluşturuldu. Tabloda pik alanları (A₁, A₂, A₃ ve ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s), ve bağıl standart sapma (s/ \bar{A} ×100) değerleri özetlenmiştir.

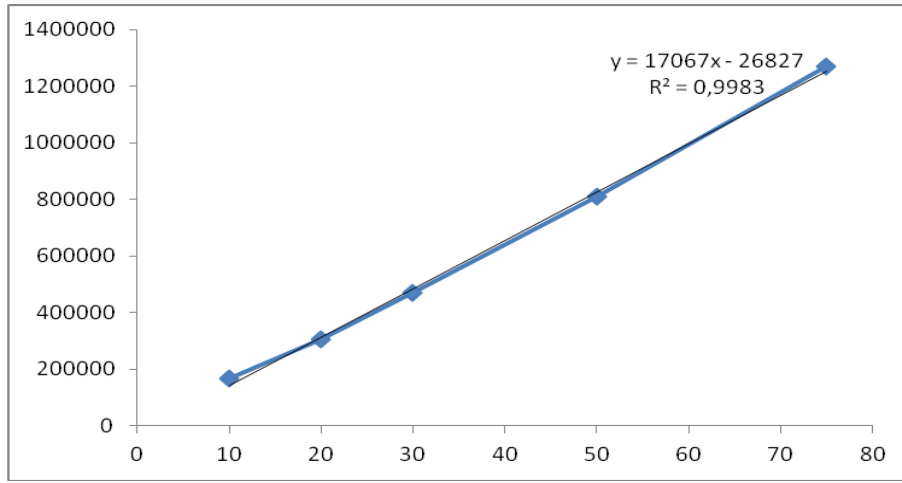
Tablo 4.14 Luteolin-7-O-glikozitin 10-75 µg/mL kons. aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Kons.(µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	SD	RSD
75	1262606	1281044	1261628	1268426	10938	0,86
50	807871	811213	816489	811857	4345	0,53
30	464621	472187	471661	469489	4224	0,89
20	301340	306649	309049	305679	3944	1,29
10	167423	167823	168247	167831	412	0,24

Tablo 4.15 Ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	SD	RSD
a	17010	17230	16962	142	0,84
b	28584	29720	22178	4066	15,16
R ²	0,9981	0,9979	0,9988		

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $A = 17067C - 26827$, korelasyon katsayısının karesi $R^2 = 0,9983$ olarak bulundu.



Şekil 4.115 Luteolin-7-O-glikozitin 10-75 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Luteolin-7-O-glikozit dedeksiyon limiti 3,45 µg/mL, kantitatif tayin limiti 10,46 µg/mL olarak bulunmuştur.

Standart maddelerin kalibrasyon eğrilerinden en küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğru denklemine bitkide bulunan boyarmaddelerin pik alanlarının ortalamaları yerleştirilerek miktarları hesaplandı (Tablo 4.16).

Tablo 4.16 Bitkide bulunan boyarmaddelerin miktarları

Boyar maddeler	Çiçek		Yaprak		Gövde	
	\bar{A}	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{A}	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{A}	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)
Rutin	335991	5,28±0,58	74814	1,24± 0,07		
Luteolin-7-O-glikozit	4096666	241,61±0,79	251638	16,32±0,83	87112	6,68±0,24
Luteolin	7045191	34,56±1,04				
Kersetin			1276682	9,09±0,49		
Kafeik asit			172602	1,30±0,01		
Klorojenik asit			697937	2,40±0,32		

4.4.4 Bitkinin Farklı Kısımlarından Maserasyon Yöntemiyle Hazırlanan EtOH Ekstresinde Bulunan Fenolik Maddelerin HPLC İle Kantitatif Analizi

Bitkinin antioksidan kapasite tayini ile fenolik madde miktarı arasındaki ilişkiyi saptayabilmek amacıyla maserasyon yöntemiyle hazırlanan etanol ekstresinde bulunan fenolik maddelerin kantitatif analizi yapıldı. Bunun için bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından mL’inde 2,0 mg bitki içeren çözeltiler hazırlandı. Standart maddelerin kalibrasyon eğrilerinden en küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğru denklemine bitkide bulunan fenolik maddelerin pik alanlarının ortalamaları yerleştirilerek miktarları hesaplandı.

Tablo 4.17 Bitkinin farklı kısımlarında bulunan fenolik maddelerin miktarı

Fenolik Bileşikler	Çiçek		Yaprak		Gövde	
	\bar{A}	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{A}	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	\bar{A}	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)
Rutin	584981	9,13±0,05				
Luteolin-7-O-glikozit	1292646	77,31±1,52			13962	2,39±0,03
Luteolin	697198	3,43±0,37				
Kersetin			195921	2,46±0,03		
Klorojenik asit	277471	1,37±0,01	292062	1,41±0,04	111830	0,96±0,01

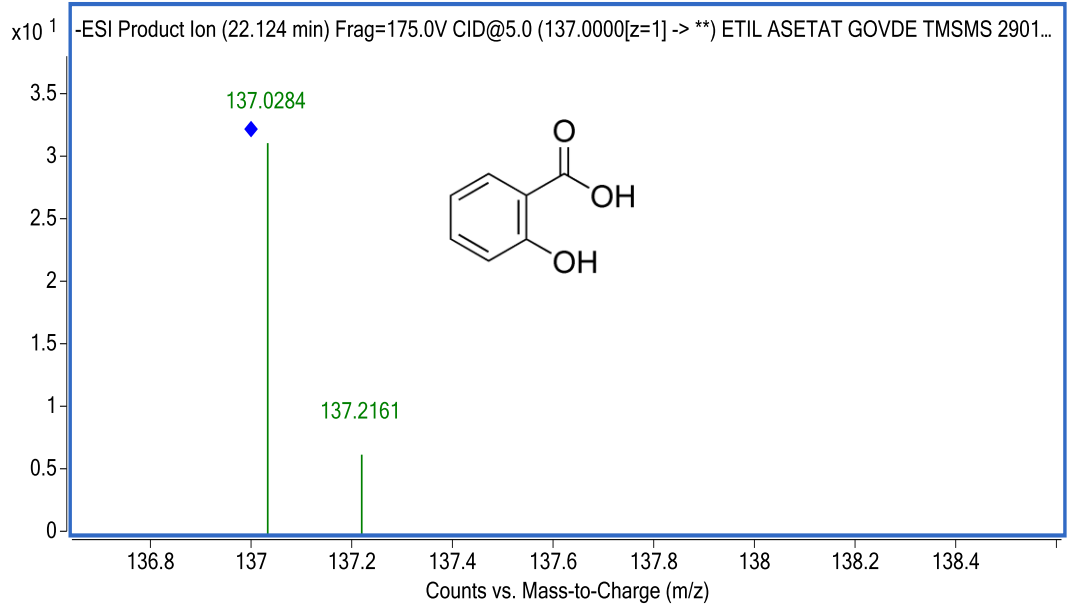
4.5. Elektrospray İyonlaşmalı Kuadropol Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi (ESI-Q-TOF LC/MS)

HPLC-DAD yöntemi kullanılarak ekstrelerde bulunan bileşikler ile standart maddelerin alıkonma zamanlarına ve aynı dalga boyundaki spektrumlarının üst üste bire bir çakışmasına bakılarak bitkide bulunan fenolik bileşikler analiz edildi. Bu bileşiklerin molekül ağırlıklarını tespit etmek ve dolayısıyla yapılarını teyit etmek amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (Merklab)'nde bulunan LC-QTOF/MS cihazı kullanıldı. Ayrıca hedef bileşiğin daha önce belirlenen alıkonma zamanları göz önüne alınarak target programı yardımıyla bileşikler MS/MS'e gönderilip fragment iyonlarının kütleleri de tespit edildi. Böylelikle bitkide bulunan tüm fenolik bileşiklerin ve o bileşiklere ait fragmentlerinin molekül ağırlıkları hem standart maddelerin verdiği fragmentlerle hem de literatür bilgileriyle karşılaştırıldı. Daha önce spektrumları ile tanımlanan fenolik bileşiklerin yapılarının doğruluğu Q-TOF LC/MS/MS sistemi kullanılarak da desteklenmiş oldu. Bu sistem sayesinde yapıları belirlenen bileşiklerin alıkonma zamanları, molekül ve parçalanma ürünlerinin ağırlıkları, kapalı formülleri Tablo 4.18'de gösterilmiştir.

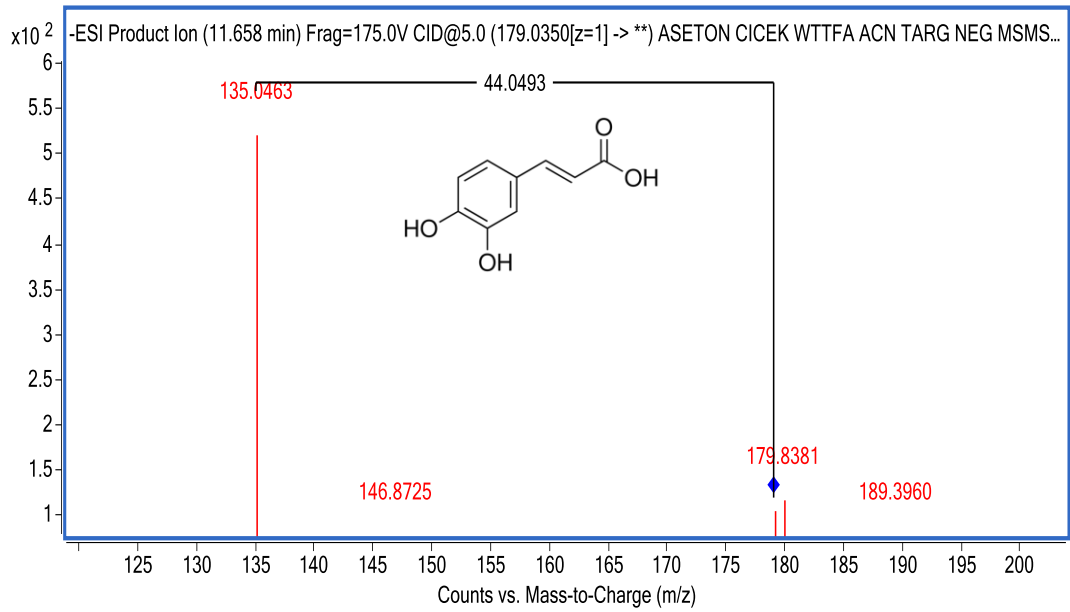
Tablo 4.18 HPLC-DAD ve LC-QTOF/MS kullanılarak *A. grandifolia*'nın içerdği fenolik bileşiklerin karakterizasyonu

Bileşikler	A.Z. (dk)	Ma	Mol. yapısı	m/z deneysel	m/z teorik	λ_{max} (nm)	Fragment iyonları
Salisilik asit	22,12	138,12	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244	137,0284	237, 303	137
Kersetagetin 3,6-dimetil eter	24,67	346,28	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	345,0616	345,0565	258, 350	330, 315, 287
Luteolin	23,60	286,24	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	285,0368	252, 347	133, 151, 175, 199, 217
Luteolin-7- O-glikozit	17,02	448,37	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0933	447,0876	255, 354	285
Kafeik asit	11,66	180,16	C ₉ H ₈ O ₄	179,0329	179,0350	217,234, 323	135
Klorojenik asit	10,99	354,31	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	353,0913	218, 235, 325	191, 179
Rutin	16,46	610,52	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,2080	609,1875	255, 353	301
Kersetin	24,02	302,23	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	300,8512	300,9021	254, 370	151, 121
di-O-kafeoil kinik asit	18,19	516,45	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1277	515,1113	216,234, 327	353,191, 179
di-O-kafeoi lkinik asit	19,10	516,45	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	629,0977	629,1022	216,234, 327	515, 353, 179

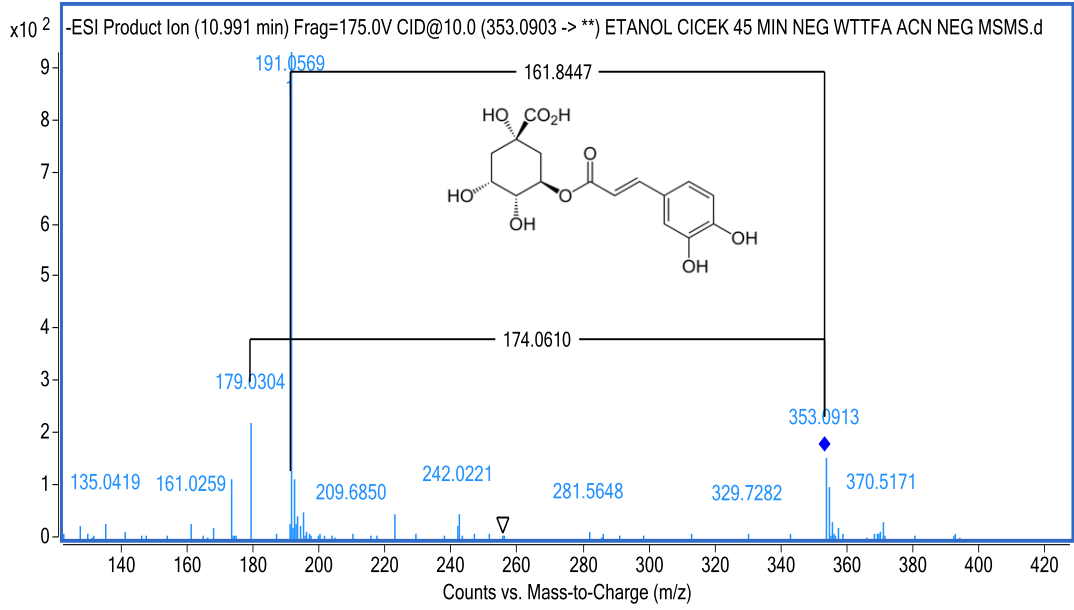
4.5.1 ESI-Q-TOF LC/MS analiz sonuçları



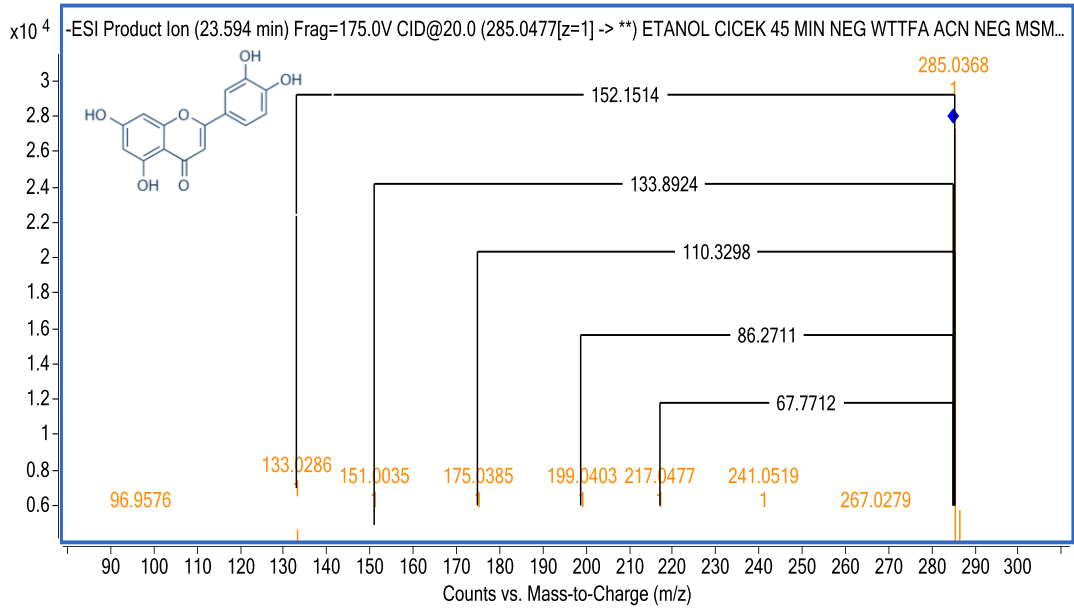
Şekil 4.116 Bitkide bulunan salisilik asit molekülünün MS spektrumu



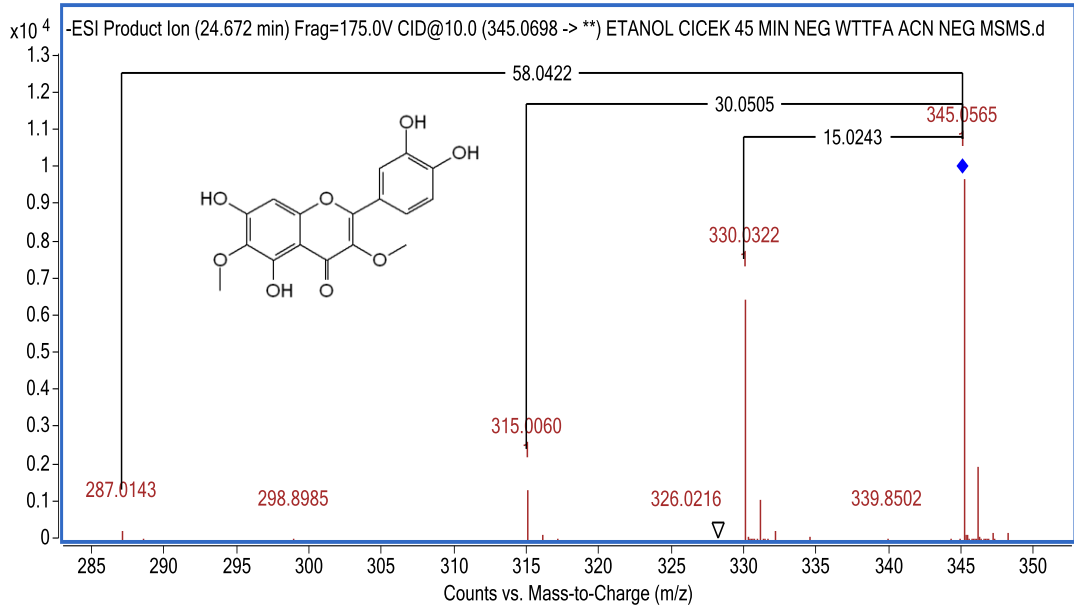
Şekil 4.117 Bitkide bulunan kafeik asit molekülünün MS/MS fragmentleri



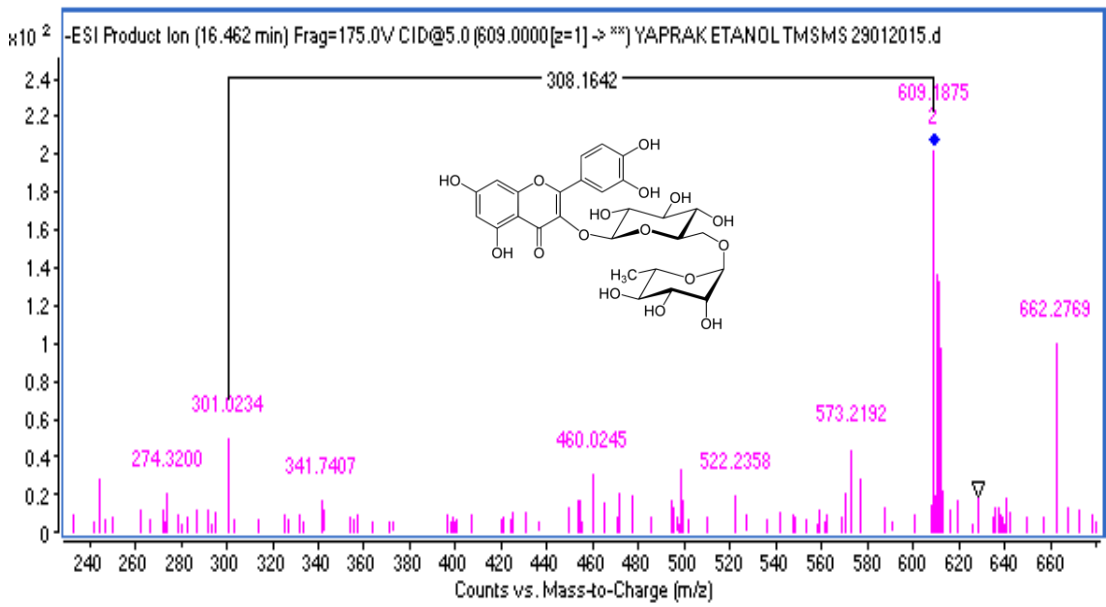
Şekil 4.118 Bitkide bulunan klorojenik asit molekülünün MS/MS fragmentleri



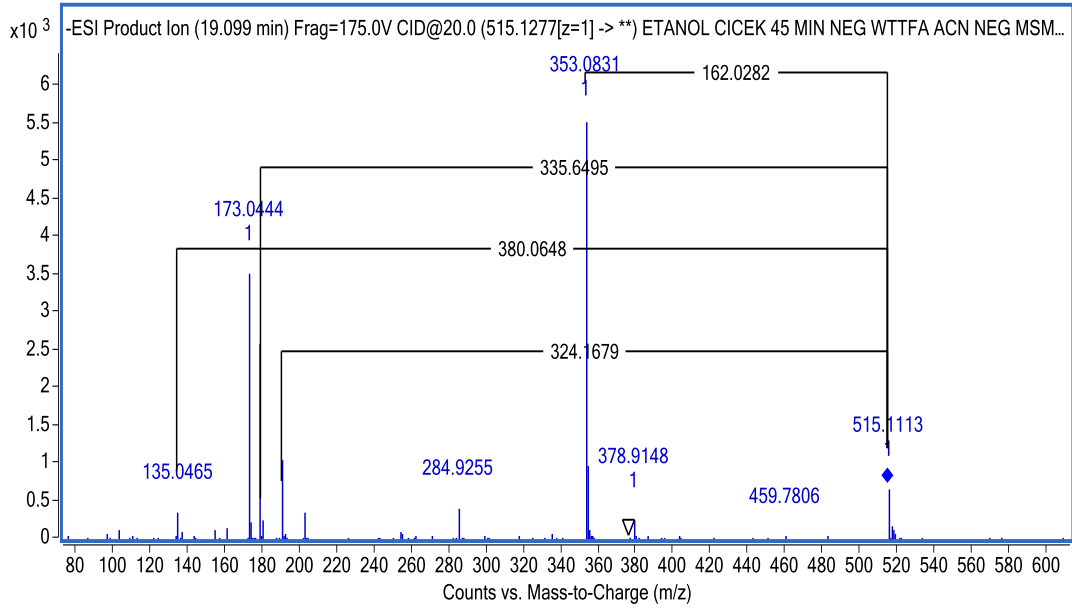
Şekil 4.119 Bitkide bulunan luteolin molekülünün MS/MS fragmentleri



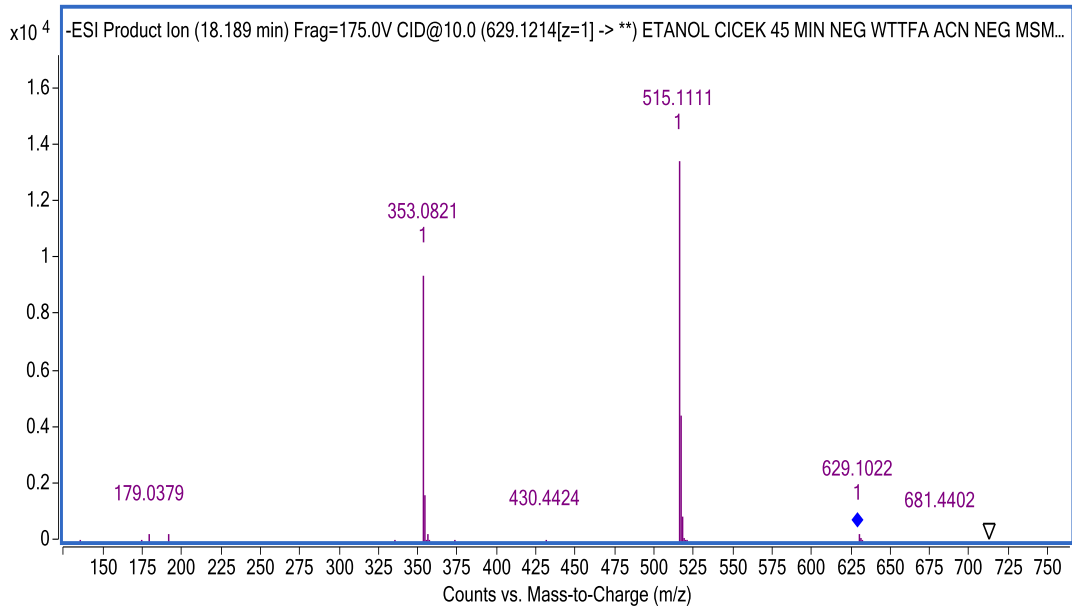
Şekil 4.120 Bitkide bulunan kersetagetin 3,6-dimetil eter molekülünün MS/MS fragmentleri



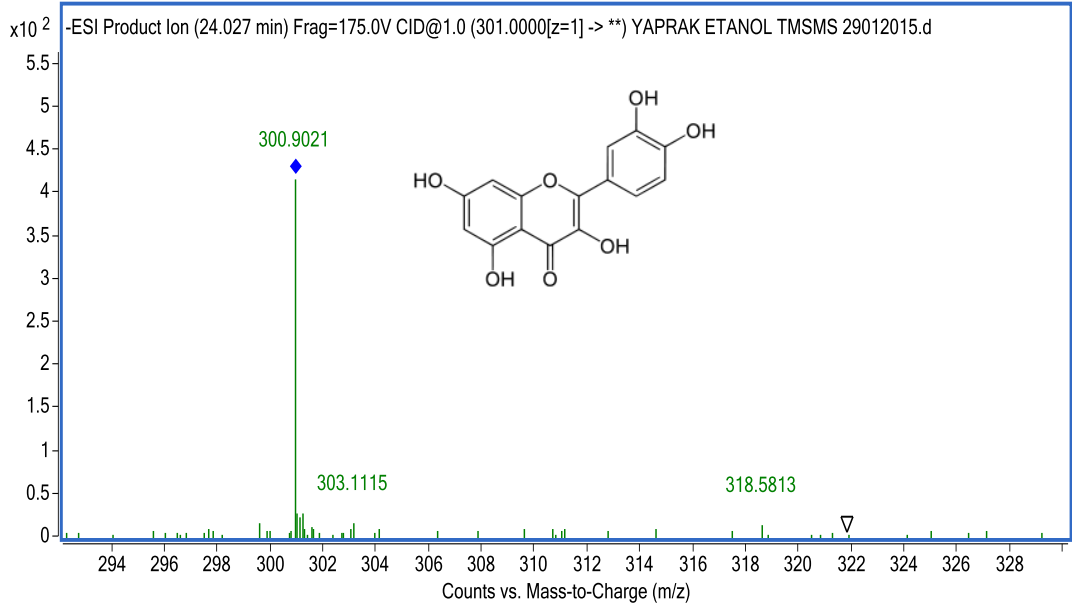
Şekil 4.121 Bitkide bulunan rutin molekülünün MS/MS fragmentleri



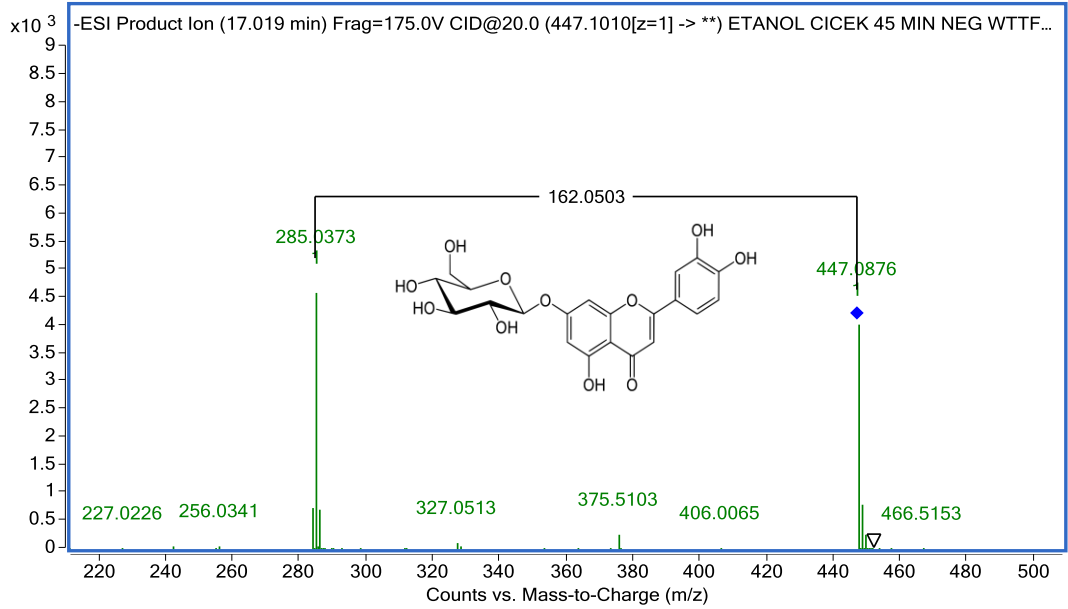
Şekil 4.122 Bitkide bulunan dikafeoil kinik asit molekülünün MS/MS fragmentleri



Şekil 4.123 Bitkide bulunan dikafeoil kinik asit + TFA molekülünün MS/MS fragmentleri

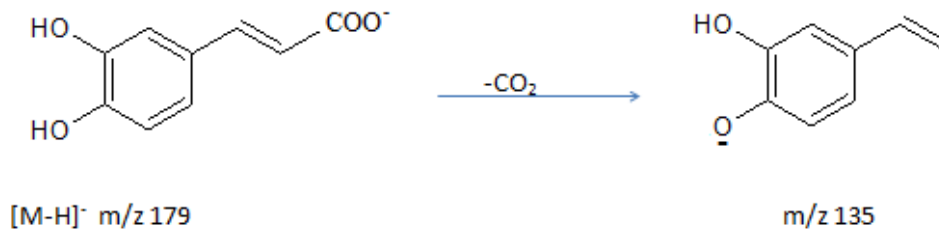


Şekil 4.124 Bitkide bulunan kersetin molekülünün MS spektrumu



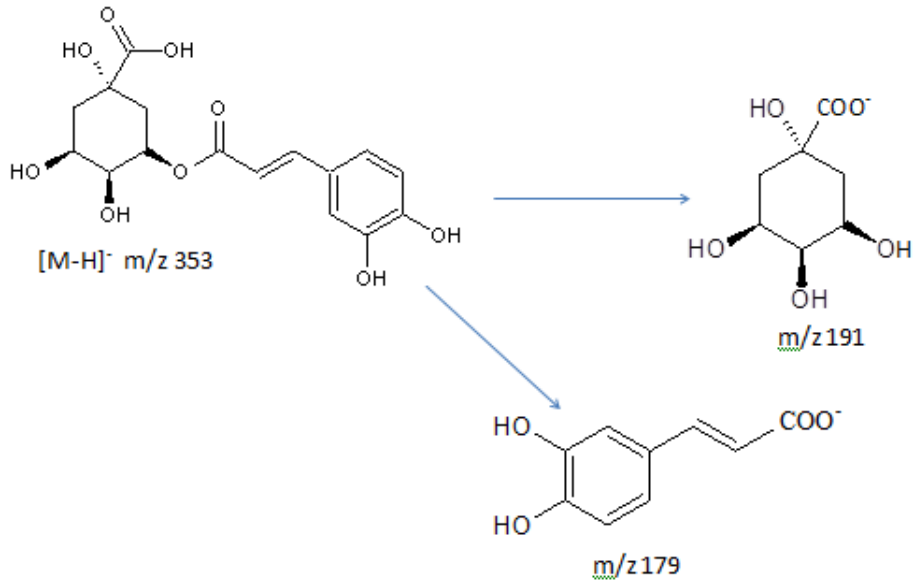
Şekil 4.125 Bitkide bulunan luteolin-7-O-glikozit molekülünün MS spektrumu

Bitkide bulunan fenolik bileşiklerin her biri farklı kollüzyon enerjisi ile tamamen kendi kimyasal yapısına göre fragmentler verirler. Referans maddelerin aynı alıkonma zamanlarında üst üste verdikleri spektrum yardımıyla maddenin yapısını bildiğimiz ve LC/MS ESI(-)'de de yine aynı gradient programda aynı alıkonma zamanlarında görülen negatif yüklü moleküllerin kütlelerini ve fragment iyonlarını hem standartlarla hem de literatürle kıyaslayarak maddelerin kesin teşhisi yapılmıştır. Şekil 4.116'da molekül kütlesi 138,123 g/mol salisilik asitin MS spektrumunda bir protonunu kaybetmiş negatif yüklü molekülünün kütlesi olan 137,0284'ü vermiştir. Şekil 4.117'de bitkinin çiçek kısmından hazırlanan aseton ekstresinde bulunan kafeik asit molekülünün MS/MS fragmentlerini vermektedir. Şekil 4.126'da görüldüğü gibi kafeik asit molekülünden 44,0493 molekül ağırlığına sahip CO₂ molekülü ayrılmış ve 135,0463 fragment iyonunu oluşturmuştur.



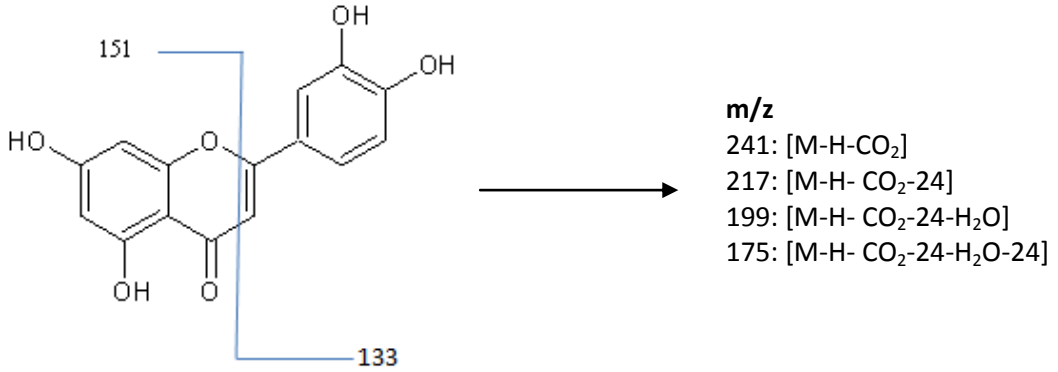
Şekil 4.126 Kafeik asit molekülünün parçalanma ürünü (Santos ve ark, 2013).

Şekil 4.118'de bitkinin çiçek kısmının etanol ekstresinde HPLC-DAD sistemiyle bulunan klorojenik asit molekülünün MS/MS fragmentleri verilmiştir. Klorojenik asitin molekül ağırlığı 354,31 g/mol iken bir protonu kopmuş molekülü 353,0913'ü vermiştir. Klorojenik asitin kafeoil kısmının molekülünden ayrılmasıyla 191,0569; kinik kısmının ayrılmasıyla da 179,0304 molekül kütleli fragment iyonu oluşmuştur (Şekil 4.127).



Şekil 4.127 Klorojenik asit molekülünün parçalanma ürünleri

Şekil 4.119’da luteolin molekülüne ait MS/MS fragmentleri verilmektedir. Luteolin molekülü 286,24 molekül kütlesine sahiptir ve 285,0368 iyonunu parçalamıştır.

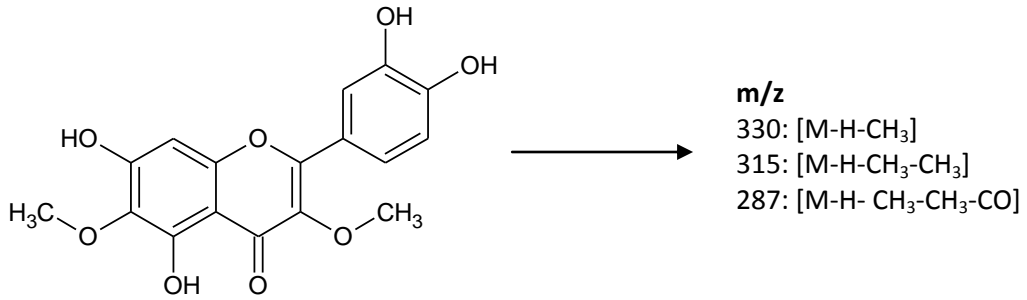


[M-H]⁻ m/z 285

Şekil 4.128 Luteolin molekülünün parçalanma ürünleri

Şekil 4.120’de bitkinin çiçek kısmının etanol ekstresinde bulunan kersetagetin 3,6-dimetil eter molekülünün MS/MS fragmentleri görülmektedir. Molekül kütlesi 346,28 g/mol olan kersetagetin 3,6-dimetil eterin MS spektrumunda bir proton kaybetmiş iyonik haldeki molekül kütlesi ise 345,0565’dir. Kersetagetin 3,6-dimetil eter molekülünden CH₃ ayrılıp 330,0322, C₂H₆ ayrılıp 315,0060 molekül kütleli fragmentlerini vermiştir. Ayrıca kersetagetin 3,6-dimetil eter molekülünden

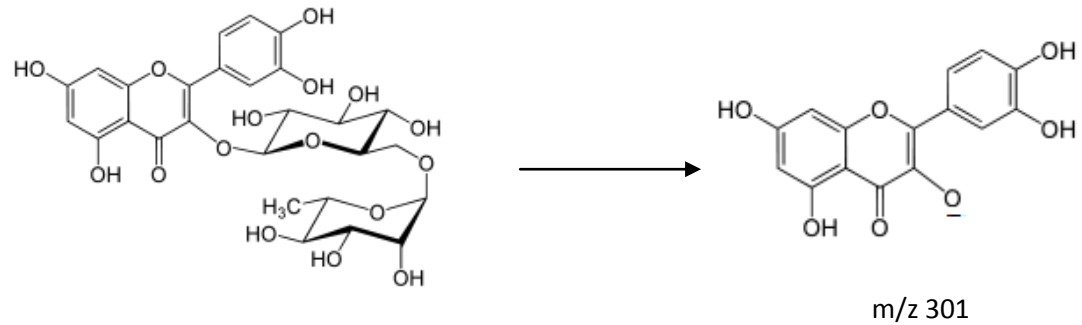
metoksiflavonoidlerde sıkça görülen $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ kaybı sonucu 287,0143 fragmenti görülmüştür (Şekil 4.129).



[M-H]⁻ m/z 345

Şekil 4.129 Kersetageetin 3,6-dimetil eter molekülünün parçalanma ürünleri

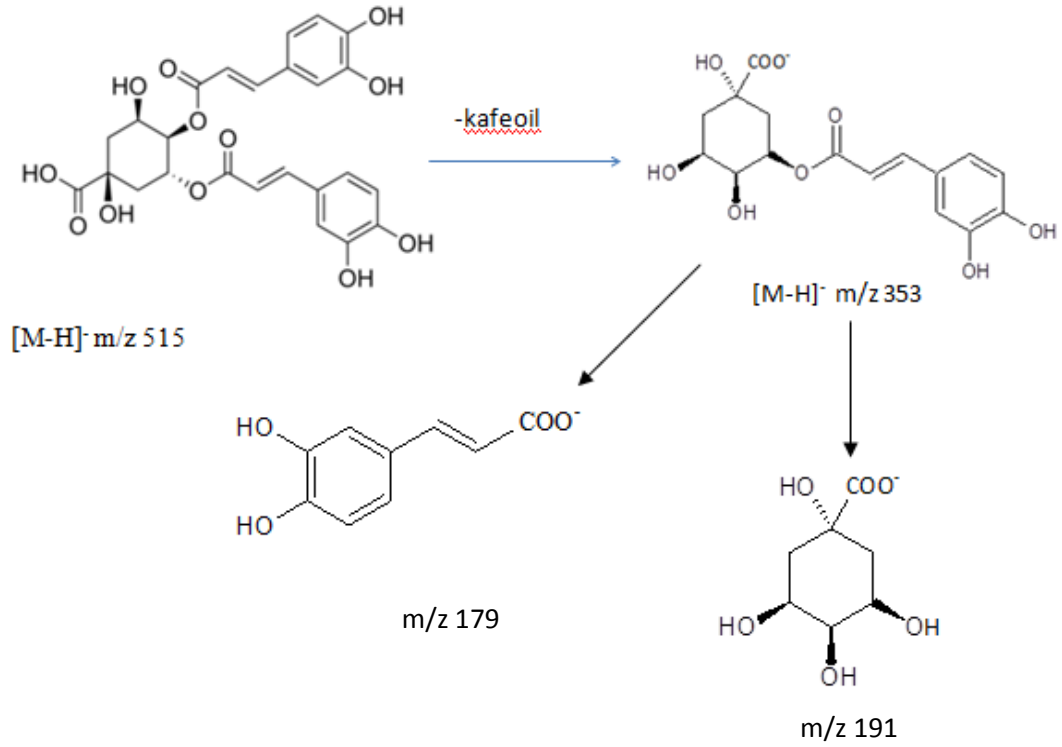
Şekil 4.121’de bitkinin yaprağının etanol ekstresinde bulunan rutin molekülüne ait MS spektrumu verilmiştir. Rutin 610,52 g/mol molekül ağırlığına sahiptir ve MS spektrumunda 609,1875 iyonik molekülünün parçalandığı görülmüştür. Rutin (kersetin-3-O-rutinozit) kersetin aglikonuna şeker bağlanmasıyla oluşmuş bir moleküldür ve MS/MS fragmentinde de şeker kısmının ayrılmasıyla kersetin aglikonunun 302,236 g/mol molekül ağırlığından bir proton kaybederek 301,0234 g/mol molekül ağırlığındaki fragmentini vermiştir (Şekil 4.130).



[M-H]⁻ m/z 609

Şekil 4.130 Rutin molekülünün parçalanma ürünü

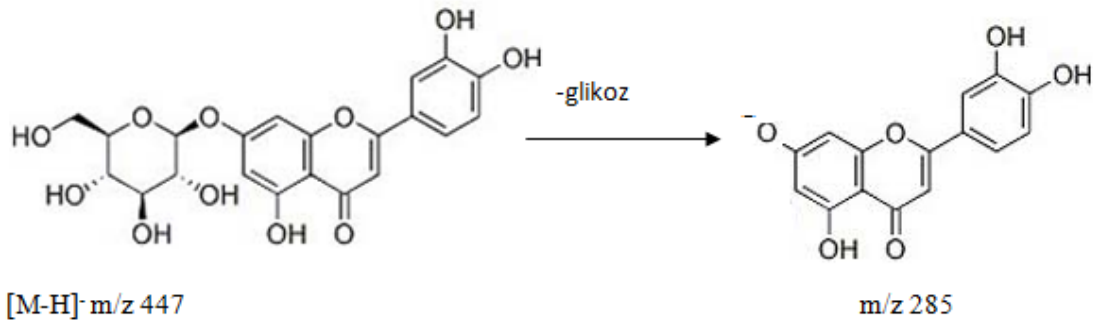
Şekil 4.122’de di-O-kafeoil kinik asit molekülünün MS spektrumunda 353 ve 173 fragmentleri görülmektedir. Şekil 4.131’de 353 fragmenti M-H-kafeoil; 173 fragmenti ise M-H-kafeoil-kinik molekül iyonlarının ayrılmasıyla meydana gelmiştir (173; kinik asit-H⁺-H₂O).



Şekil 4.131 di-O-kafeoil kinik asit molekülünün parçalanma ürünleri (Schütz ve ark, 2005).

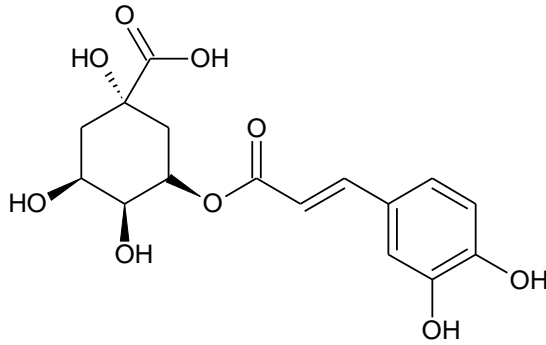
Şekil 4.123'de 515 prekürsör iyonunun parçalandığı di-O-kafeoil kinik asit molekülüne mobil fazda kullanılan TFA'nın molekül kütlesi olan 114'ün bağlanmasıyla 629 iyonu parçalanmıştır. Dolayısıyla di-O-kafeoil kinik asit molekülü 629 iyonu ile belirmiştir. Bunun gibi aranan bir molekül kütlesi yerine o moleküle mobil faz olarak kullanılan bir çözücünün eklenmesi LC-MS'te mümkündür. Buradaki 629 iyonu aslında 515 prekürsör iyonunun ve dolayısıyla dikafeoil kinik asitin yapı izomerlerinden birinin parçalanmasına aittir.

Şekil 4.124'de bitkinin yaprak kısmının etanol ekstresinde bulunan kersetin molekülün MS spektrumu görülmektedir. Kersetin 302,236 molekül kütlesine sahiptir ve MS spektrumunda kersetin molekülü bir proton kaybetmiş 300,9021 molekül kütleli iyonu parçalanmıştır. Şekil 4.125'de bitkinin çiçek kısmının etanol ekstresinde bulunan 447 iyonuna ait MS/MS fragmenti görülmektedir. 448,37 mol kütleli luteolin-7-O-glikozit molekülünden glikoz kısmı ayrılıp luteolin aglikonundan bir protonun ayrılmasıyla oluşan 285,0373 mol kütleli iyonu görülmektedir (Şekil 4.132).

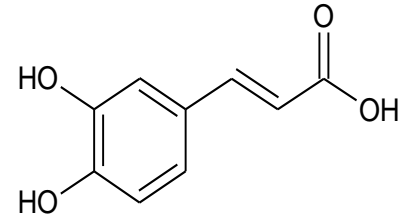


Şekil 4.132 Luteolin-7-O-glikozit molekülünün parçalanma ürünü

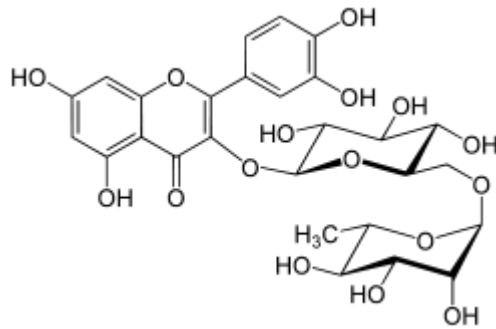
4.5.2 *Achillea grandifolia* bitkisinin içerdiği fenolik maddelerin molekül formülleri



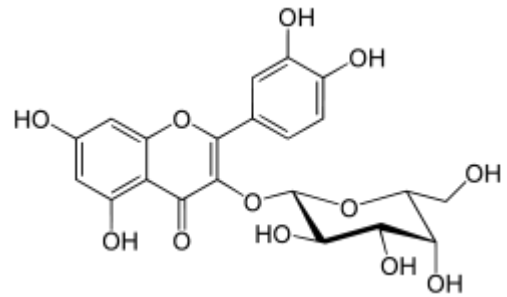
Klorojenik asit



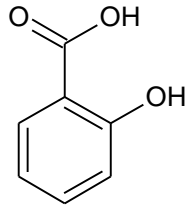
Kafeik asit



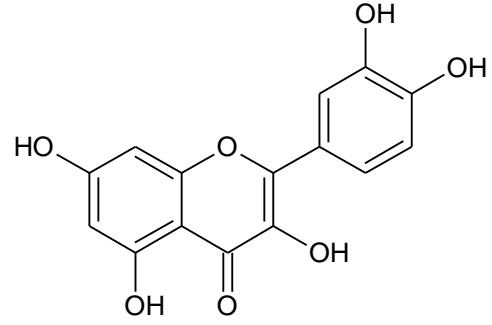
Rutin



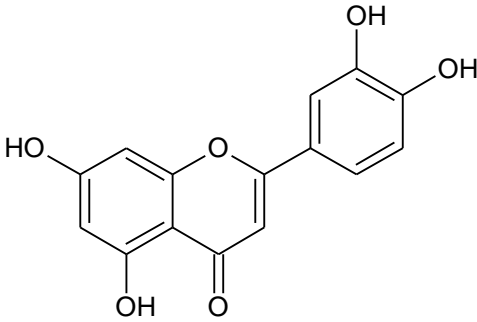
Luteolin-7-O-glikozit



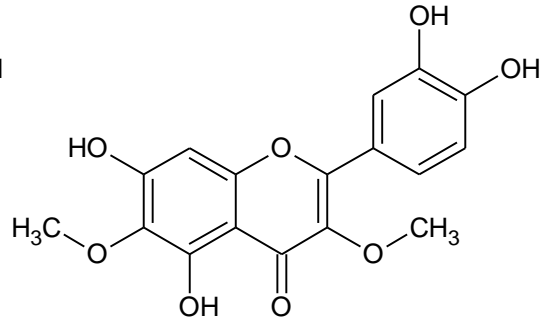
Salisilik asit



Kersetin



Luteolin



Kersetagetin 3,6-dimetil eter

Şekil 4.133 *A. grandifolia* bitkisinde bulunan fenolik bileşenlerin molekül formülleri

4.6. Bitkinin Çiçek, Yaprak ve Gövde Kısımından Hazırlanan Etanol Ekstrelerinin Antioksidan Kapasite Sonuçları

Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından maserasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan etanol ekstrelerinin antioksidan kapasiteleri aşağıdaki yöntemlerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca, bu kısımların içerdiği toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları belirlenerek bitkinin içerdiği fenolik bileşikler ile antioksidan kapasite arasındaki korelasyon incelenmiştir.

4.6.1 Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC)

Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından elde edilen ekstrelerin 0,05-0,25 mg/mL konsantrasyon aralığındaki CUPRAC değerleri (μM TEAC) Tablo 4.19'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Çiçek ekstresi her üç konsantrasyonda da yaprak ve gövde ekstrelerine göre yüksek oranda Cu(II)'yi Cu(I)'e indirgeme gücüne sahiptir. Ekstrelerin CUPRAC değerleri kıyaslandığında en yüksek kapasiteyi sırasıyla çiçek,

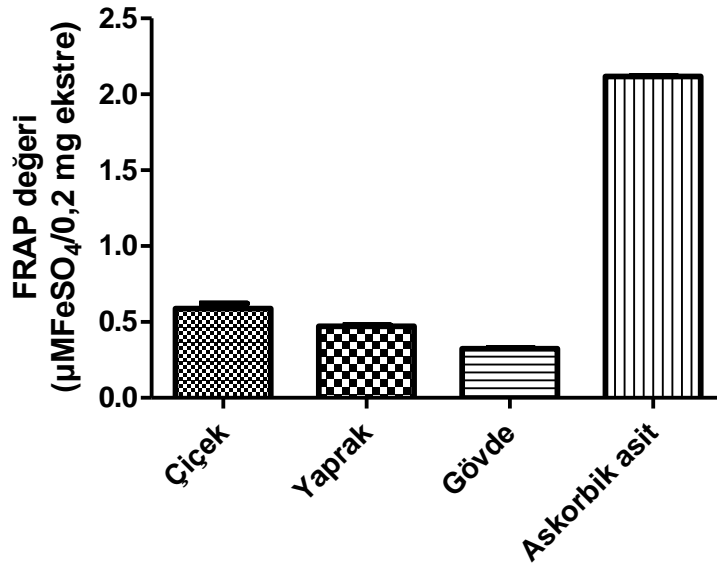
yaprak ve gövde ekstralarının gösterdiği saptandı. Bu sonuçlara göre çiçek ekstresi Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgeme potansiyelinin yüksek olmasından dolayı doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Tablo 4.19 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının CUPRAC değerleri ($\mu\text{M TEAC}$)

Ekstre	CUPRAC değeri ($\mu\text{M TEAC}$)		
	0,05 mg/mL	0,1 mg/mL	0,25 mg/mL
Çiçek	0,0570 \pm 0,001	0,0929 \pm 0,002	0,2032 \pm 0,004
Yaprak	0,048 \pm 0,0006	0,066 \pm 0,001	0,157 \pm 0,002
Gövde	0,014 \pm 0,0006	0,0297 \pm 0,0007	0,0610 \pm 0,002

4.6.2 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (FRAP)

Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından elde edilen ekstralardan hazırlanan 0,2 ve 0,1 mg örnek içeren çözeltilerin FRAP değerleri Tablo 4.20'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Çiçek ekstresi her iki konsantrasyonda da yaprak ve gövde ekstralarına göre yüksek oranda Fe(III)'ün Fe(II)'e indirgeme gücüne sahiptir. Ekstreler ve standartın FRAP değerleri kıyaslandığında en yüksek aktiviteyi sırasıyla askorbik asit, çiçek, yaprak ve gövde ekstralarının gösterdiği saptandı (Şekil 4.134). Bu sonuçlara göre çiçek ekstresinin Fe(III)'ün Fe(II)'e indirgeme potansiyelinin yüksek olmasından dolayı doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.



Şekil 4.134 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının FRAP değerleri ($\mu\text{M FeSO}_4/0,2 \text{ mg ekstre}$)

Tablo 4.20 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının FRAP değerleri ($\mu\text{M FeSO}_4$)

FRAP değeri ($\mu\text{M FeSO}_4$)		
Ekstre ve Standart madde	0,2 mg	0,1 mg
Çiçek	0,59± 0,05	0,26± 0,01
Yaprak	0,47 ±0,01	0,17 ±0,01
Gövde	0,3247 ± 0,006	0,16 ± 0,001
Askorbik asit	2,118 ± 0,003	2,116±0,002

4.6.3 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)

A. grandifolia bitkisinin çiçek, yaprak ve gövde kısmından hazırlanan etanol ekstralarının ve BHA standartının farklı konsantrasyonlarda ABTS katyon radikalini giderme kapasitelerinin yüzdesi Tablo 4.21’de verilmiştir. 0,08 mg yaprak ekstresinin ABTS katyon radikalini süpürücü aktivitesi çiçek ve gövde ekstralarından daha yüksek olduğu tespit edildi. 0,04 mg, 0,02 mg ve 0,01 mg çiçek ekstresinin

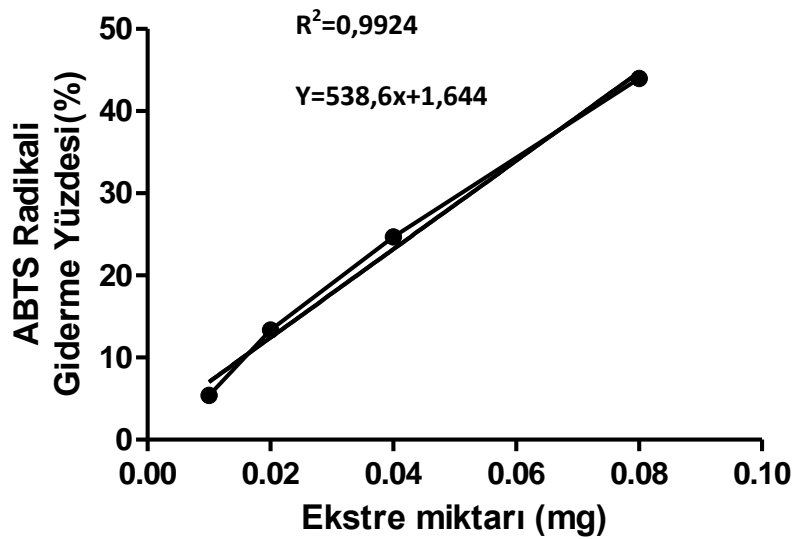
yaprak ve gövde ekstrelerinden daha yüksek radikal süpürücü aktivite gösterdiği saptandı. Bütün konsantrasyonlarda gövde ekstresinin en düşük aktivite gösterdiği belirlendi.

0,02 mg'da hem ekstrelerin hem de standartın radikal süpürücü aktiviteleri kıyaslandığında en yüksek aktiviteyi sırasıyla BHA, çiçek, yaprak ve gövde ekstrelerinin gösterdiği tespit edildi.

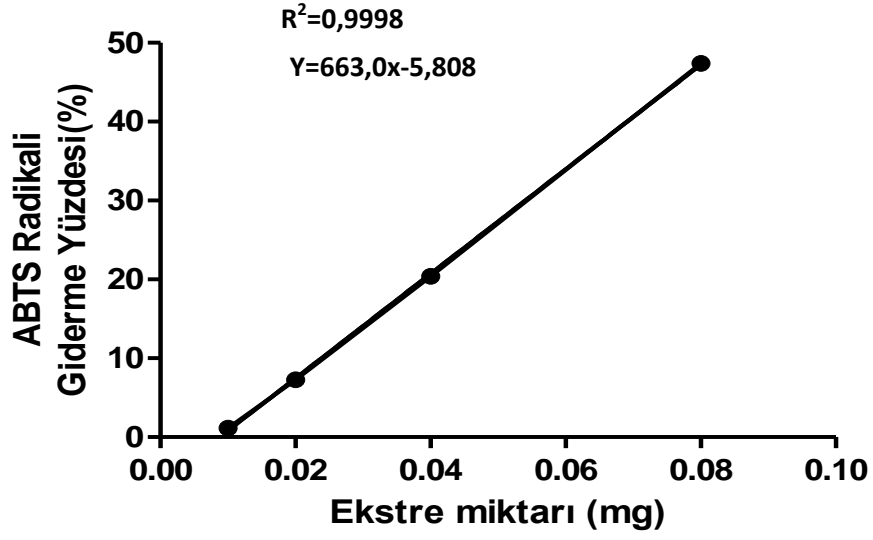
Tablo 4.21 Bitkinin farklı kısımlarının ve standartların ABTS katyon radikali süpürücü kapasite yüzdeleri (%)

Ekstre (mg)	ABTS ⁺ süpürücü kapasite yüzdeleri (%)			
	Çiçek	Yaprak	Gövde	BHA
0,08	43,96	47,40	14,28	
0,04	25,23	20,38	6,14	
0,02	13,34	7,28	2,42	96,02
0,01	5,38	1,17	0,42	58,20

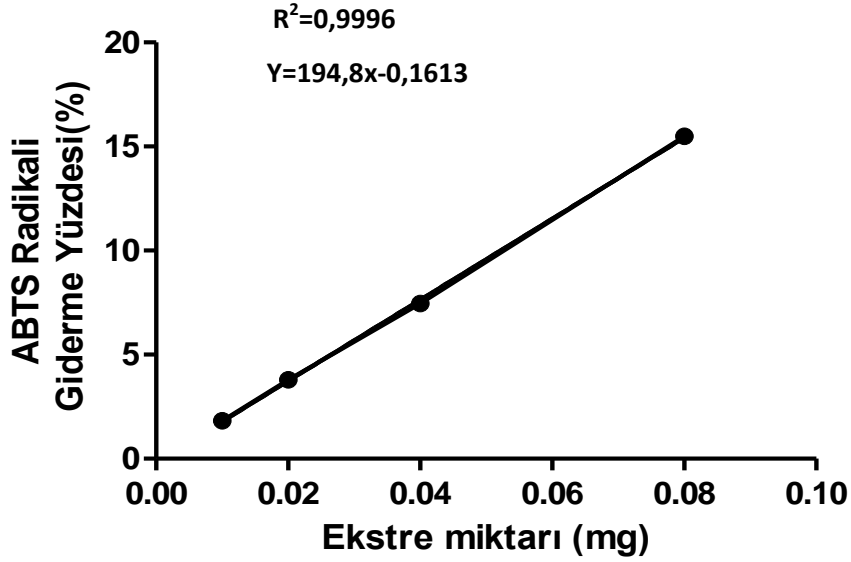
Çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının konsantrasyona bağlı ABTS radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri arasında çizilen kalibrasyon eğrisi ve eğrinin doğru denklemi ile korelasyon katsayıları Şekil 4,135-4,137'de gösterilmiştir.



Şekil 4.135 Çiçek ekstresinin ABTS katyon radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri



Şekil 4.136 Yaprak ekstresinin ABTS katyon radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri



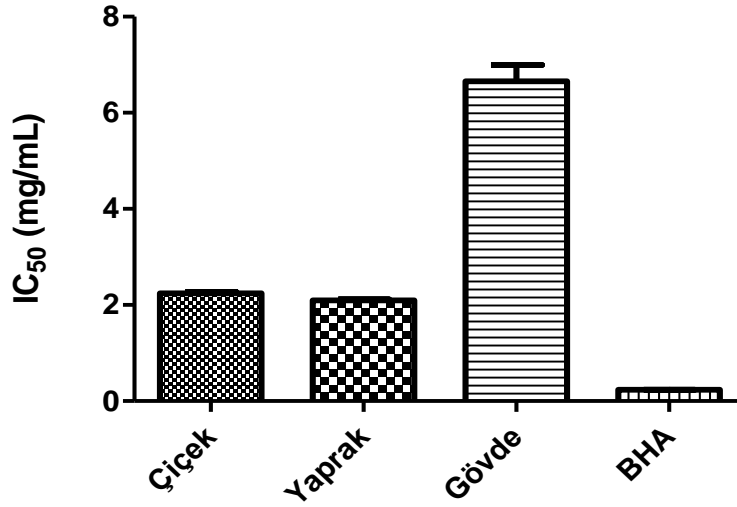
Şekil 4.137 Gövde ekstresinin ABTS katyon radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri

Bitkinin farklı kısımlarından hazırlanan etanol ekstralarının ve standartların IC₅₀ değerleri (mg/mL) Tablo 4.22’de ve Şekil 4.138’de verilmiştir. IC₅₀ değeri ile antioksidan kapasite arasındaki ters orantı göz önüne alındığında, yaprak ekstresinin çiçek ekstresinden, çiçek ekstresinin ise gövde ekstresinden daha yüksek ABTS katyon radikalini süpürücü aktivite gösterdiği tespit edildi. Ekstreler ve BHA’nın ABTS katyon radikalini süpürücü aktiviteleri kıyaslandığında en yüksek aktiviteyi sırasıyla BHA, yaprak, çiçek ve gövde ekstralarının gösterdiği tespit edildi.

0,04; 0,02 ve 0,01 mg ekstre içeren çözeltilerin ABTS katyon radikalini süpürücü kapasitelerinin yüzdeleri karşılaştırıldığında çiçek ekstresinin radikal süpürücü kapasite yüzdesinin diğer ekstralardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak 0,08 mg ekstre içeren çözeltiler kendi aralarında kıyaslandığında yaprak ekstresinin radikal süpürücü yüzdesinin daha yüksek olduğu görülür. Bütün konsantrasyonlar baz alınarak hesaplanan IC₅₀ değerlerine bakıldığında ise yaprak ekstresinin diğer ekstralere göre daha güçlü antioksidan kapasite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, antioksidan çalışmalarında tüm konsantrasyonlara bağlı olarak hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre antioksidan kapasite sonuçlarının yorumlanması önerilmektedir. Bitki ekstralarının TEAC değerleri Tablo 4.23’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bitkinin yaprak kısmıyla hazırlanan ekstrenin TEAC değeri diğer ekstralardan daha yüksek çıkmıştır. Bu sonuç IC₅₀ değerleriyle doğrusal bir ilişkinin olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.22 *A. grandifolia* bitkisinin farklı kısımlarından hazırlanan ekstraların ve standartların IC₅₀ değerleri (mg/mL)

Ekstre ve standartlar	IC ₅₀ Değerleri (mg/mL)
Çiçek	2,24± 0,05
Yaprak	2,10±0,03
Gövde	6,66± 0,57
BHA	0,23± 0,01



Şekil 4.138 Çiçek, yaprak, gövde ve standartların IC₅₀ değerleri

Tablo 4.23 Bitki ekstralarının TEAC değeri olarak antioksidan kapasiteleri

Ekstre	mM TEAC / mg ekstre
Çiçek	14,25 ± 0,03
Yaprak	15,38 ± 0,03
Gövde	4,25 ± 0,02

4.6.4 DPPH radikali giderme kapasitesinin sonuçları

A. grandifolia bitkisinin çiçek, yaprak ve gövde kısmından hazırlanan etanol ekstralarının serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali kullanılarak tayin edildi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar BHT ve askorbik asitin DPPH radikali giderme kapasiteleri ile karşılaştırıldı.

Çiçek, gövde, yaprak ve standartların farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri Tablo 4.24'te gösterilmiştir. Çiçek, yaprak ve gövde ekstralarının 0,2-0,0125 mg örnek içeren çözeltileri kıyaslandığında bütün konsantrasyonlarda çiçek ekstesinin gövde ve yaprak ekstresinden, yaprak ekstresinin ise gövde ekstresinden daha fazla DPPH radikalini süpürücü aktivite gösterdiği tespit edildi. Ayrıca standart olarak kullanılan BHT ve askorbik asitin 0,05-0,0125 mg örnek içeren çözeltilerinde DPPH radikalini süpürücü aktiviteleri

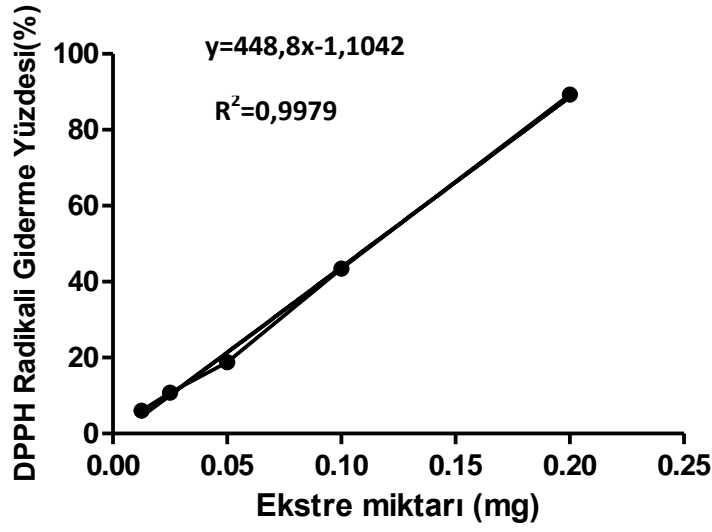
karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bütün konsantrasyonlarda askorbik asitin BHT'den daha yüksek aktivite gösterdiği saptandı. Çiçek, yaprak ve gövde ekstraları ile standartların 0,05 mg örnek içeren çözeltileri karşılaştırıldığında DPPH radikalini süpürücü kapasite yüzdelerinin aşağıdaki sırada olduğu gözlemlendi;

Askorbik asit > BHT > çiçek > yaprak > gövde

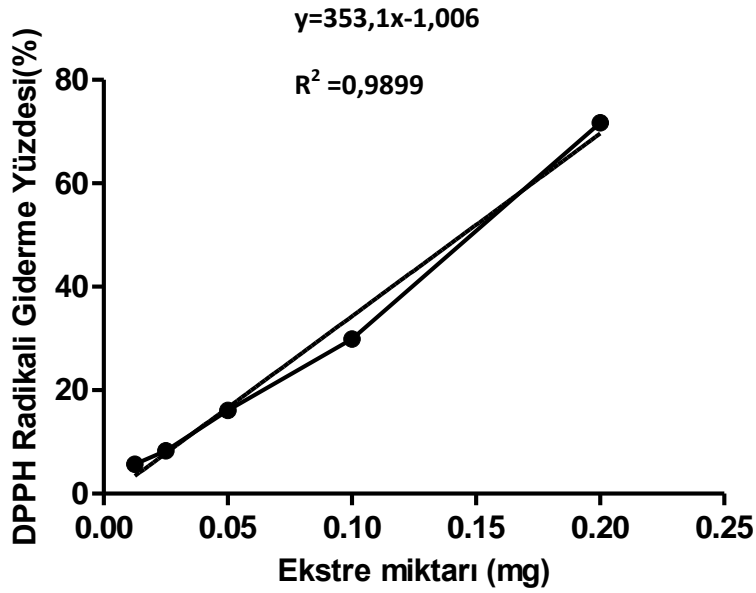
Tablo 4.24 Bitkinin farklı kısımlarının ve standartların DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri (%)

Ekstre (mg)	DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri (%)				
	Çiçek	Yaprak	Gövde	BHT	Askorbik asit
0,2	89,25	71,73	27,36		
0,1	43,46	29,92	14,34		
0,05	18,82	16,11	8,96	63,92	96,32
0,025	10,78	8,32	5,06	34,075	95,22
0,0125	6,07	5,71	3,82	17,94	52,76

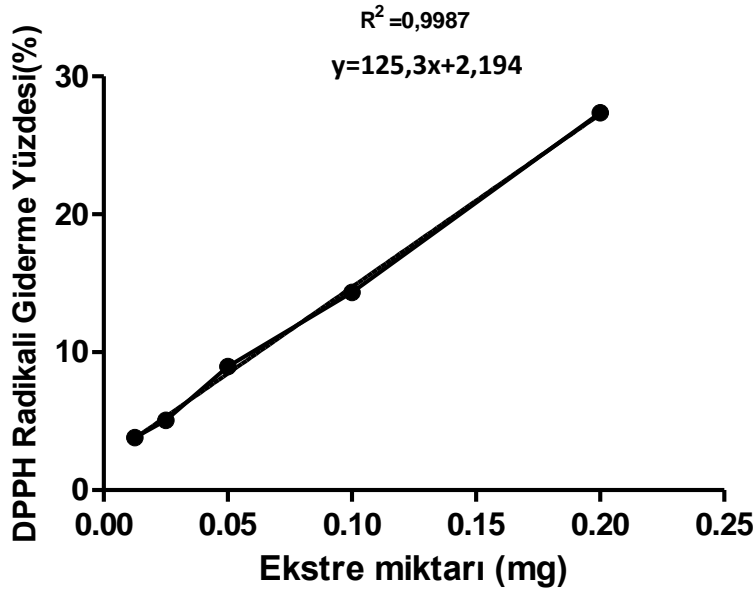
Çiçek, yaprak, gövde ve standartların konsantrasyona bağlı DPPH radikalini süpürücü kapasite yüzdeleri arasında çizilen kalibrasyon eğrileri ve doğru denklemi elde edilerek korelasyon katsayıları hesaplanarak Şekil 4.139-4.143'de gösterilmiştir.



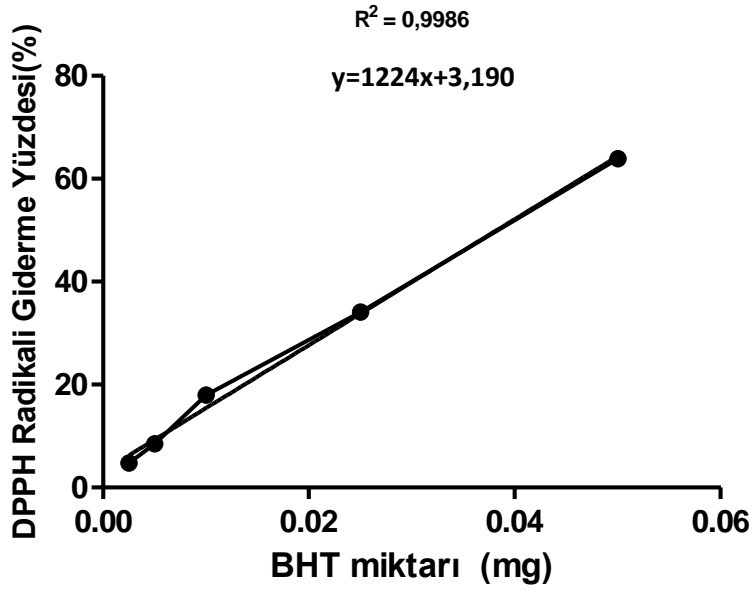
Şekil 4.139 Çiçek ekstresinin DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri



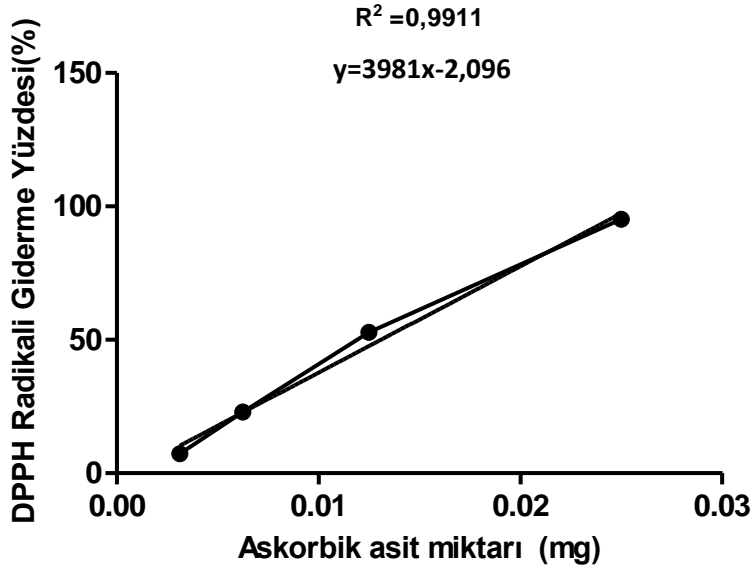
Şekil 4.140 Yaprak ekstresinin DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri



Şekil 4.141 Gövde ekstresinin DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri



Şekil 4.142 BHT standartının DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri



Şekil 4.143 Askorbik asit standartının DPPH radikali süpürücü kapasite yüzdeleri

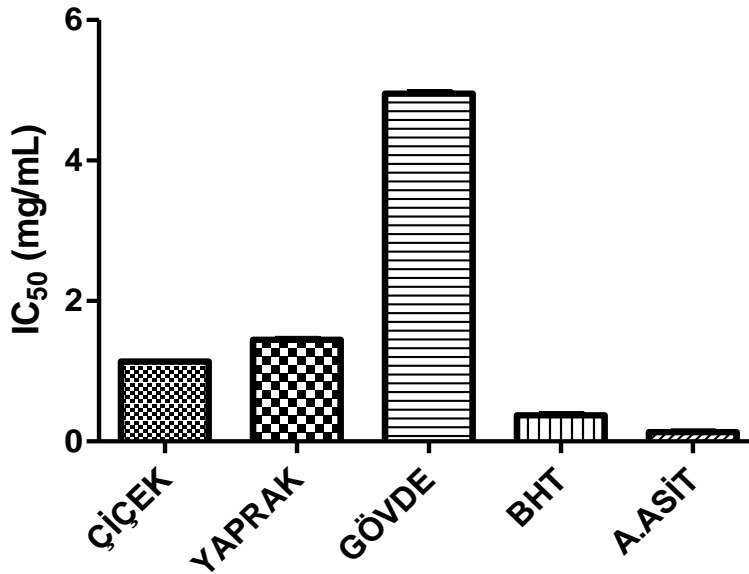
Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlanan ekstrelerin ve standartların IC₅₀ değerleri, konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme kapasite değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait doğru denklemlerinden mg/mL olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.25’de verilmiştir.

IC₅₀ değeri ile antioksidan kapasite arasındaki ters orantı göz önüne alındığında, çiçek ekstresinin yaprak ve gövde ekstresinden, yaprak ekstresinin ise gövde ekstresinden daha güçlü DPPH radikali süpürücü aktivite gösterdiği tespit edildi. Standartlar kendi arasında kıyaslandığında askorbik asitin BHT standartından daha güçlü radikal süpürücü etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Ekstrelerin radikal süpürücü kapasiteleri standartlar ile kıyaslanarak antioksidan kapasite sıralamaları aşağıda verilmiştir. Askorbik asit > BHT > çiçek > yaprak > gövde

Bitkinin çiçek ekstresinin serbest radikali süpürücü kapasitesi standartlar ile kıyaslandığında bu ekstrenin doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 4.25 *A. grandifolia* bitkisinin farklı kısımlarından hazırlanan ekstrelerin ve standartların IC₅₀ değerleri (mg/mL)

Ekstre ve standartlar	IC ₅₀ değerleri (mg/mL)
Çiçek	1,14 ± 0,01
Yaprak	1,45 ± 0,02
Gövde	4,95 ± 0,03
BHT	0,37 ± 0,01
Askorbik asit	0,13 ± 0,006



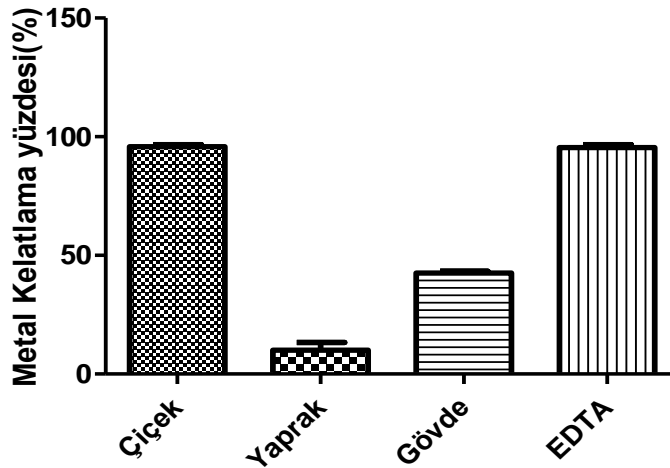
Şekil 4.144 Çiçek, yaprak, gövde ve standartların IC₅₀ değerleri

4.6.5 Bitkinin metal kelatı oluşturma kapasitesinin sonuçları

Çiçek, gövde ve yaprak ekstrelerinin metal kelatı oluşturma kapasiteleri 0,2 mg EDTA içeren çözelti ile karşılaştırmalı olarak Tablo 4.26 ve Şekil 4.145’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çiçek ekstresinin gövde ve yaprak ekstresine göre daha yüksek kelat oluşturma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin ve standartın metal kelatlama yüzdeleri kıyaslandığında en yüksek metal kelatı oluşturma kapasiteleri sırasıyla EDTA, çiçek, gövde ve yaprak ekstresi olduğu tespit edildi.

Tablo 4.26 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının metal kelatlama yüzdeleri (%)

Ekstre ve Standart madde miktarı	1,0 mg	0,2 mg
Çiçek	95,83±1,18	
Yaprak	10,00±4,70	
Gövde	42,50±1,17	
EDTA		95,42±2,14



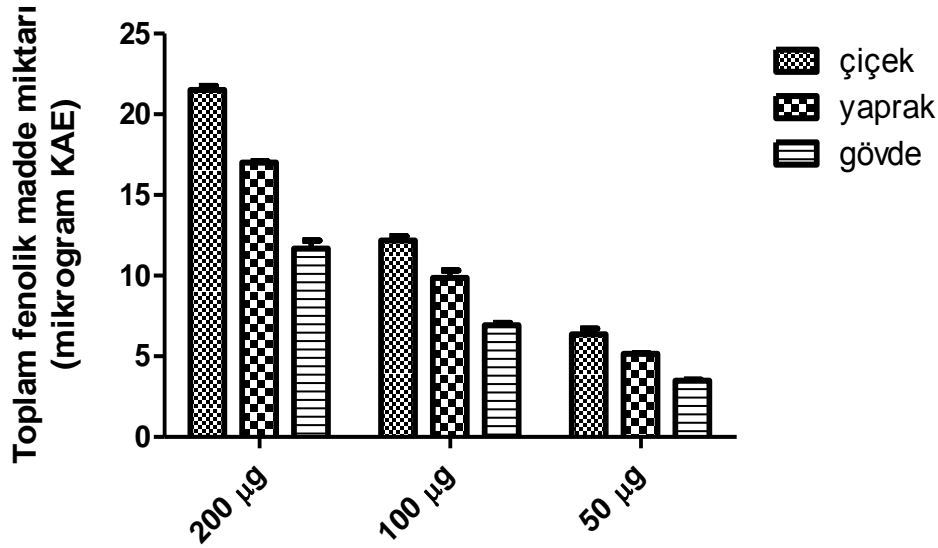
Şekil 4.145 Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının metal kelatlama yüzdeleri

4.6.6 Toplam fenolik madde (TPC) miktarı tayini sonuçları

A. grandifolia'nın çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlanan EtOH ekstralarının 200 µg/mL, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlardaki toplam fenolik madde miktarları µg kateşin eşdeğeri olarak belirlendi. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları kendi içerisinde kıyaslandığında en zengin toplam fenolik madde miktarı sırasıyla çiçek, yaprak ve gövde ekstresinde bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.27 ve Şekil 4.146).

Tablo 4.27 Toplam fenolik madde miktarı (μg KAE)

Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Çiçek	Yaprak	Gövde
200	21,50 \pm 0,34	17,02 \pm 0,01	11,67 \pm 0,89
100	12,17 \pm 0,50	9,86 \pm 0,81	6,94 \pm 0,24
50	6,36 \pm 0,61	5,16 \pm 0,01	3,48 \pm 0,12



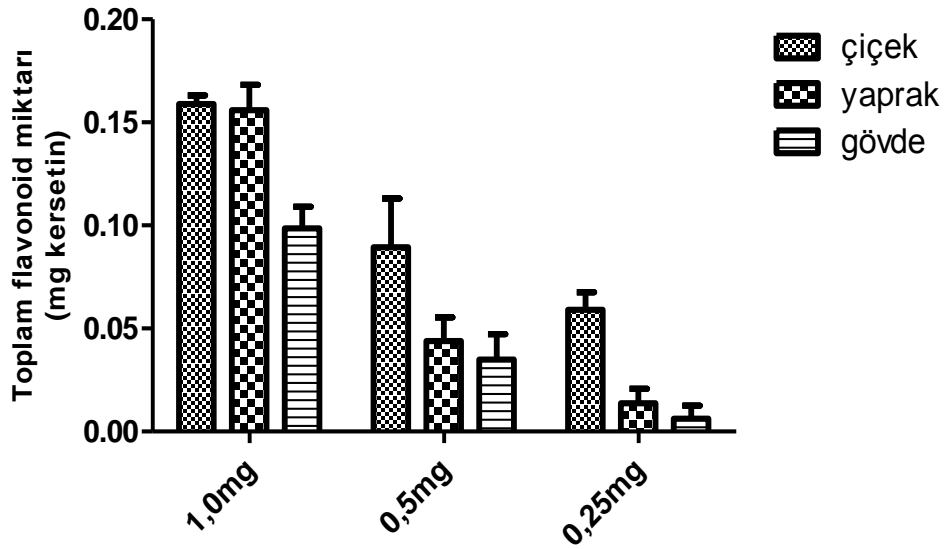
Şekil 4.146 A. *grandifolia*'dan hazırlanan EtOH ekstralarının toplam fenolik madde miktarları

4.6.7 Toplam flavonoid madde (TFC) miktarı tayini sonuçları

A. grandifolia'nın çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlanan 0,5-2,0 mg/mL konsantrasyonlardaki ekstraların toplam flavonoid madde miktarları mg kersetin eşdeğeri olarak belirlendi. Ekstrelerin toplam flavonoid madde miktarları kendi içerisinde kıyaslandığında en zengin toplam flavonoid madde miktarı sırasıyla çiçek, yaprak ve gövde ekstresinde bulunduğu tespit edildi (Tablo 4.28 ve Şekil 4.147).

Tablo 4.28 Toplam flavonoid madde miktarı (mg kersetin eşdeğeri)

Konsantrasyon (mg/mL)	Çiçek	Yaprak	Gövde
2,0	0,159± 0,007	0,156±0,02	0,099±0,02
1,0	0,089± 0,04	0,044±0,02	0,035±0,02
0,5	0,059±0,01	0,014±0,01	0,006±0,01



Şekil 4.147 *A. grandifolia*'dan hazırlanan EtOH ekstralarının toplam flavonoid madde miktarları

4.6.8 Antioksidan kapasite yöntemleri ile toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlanan EtOH ekstralarının antioksidan kapasite yöntemleri ile toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları arasındaki ilişkinin regresyon denklemi ve korelasyon katsayısının karesi Tablo 4.29'da verilmiştir.

Tablo 4.29 Antioksidan kapasite yöntemleri ile toplam fenolik ve flavonoid madde arasındaki ilişki

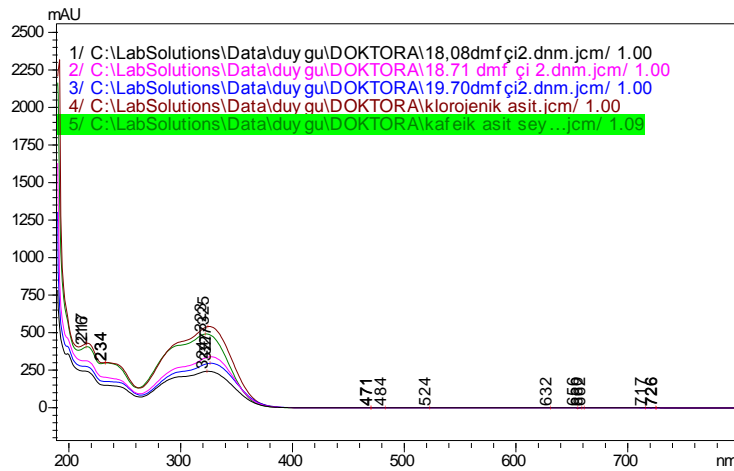
	Çiçek		Yaprak		Gövde	
	Denklem	R ²	Denklem	R ²	Denklem	R ²
TPC/DPPH	y= 4,5905x-10,284	0,9973	y = 4,7847x - 11,849	0,9734	y=2,277x-0,1162	0,9790
TPC/TEAC	y=5,7438x-0,5225	0,9816	y=5,9481x-3,8877	0,9907	y=2,6302 x - 1,0753	0,9823
TPC/Frap	y=0,0229x+0,0318	0,9835	y = 0,0153x +0,1037	0,8686	y=0,0181x+0,0665	0,9648
TPC/Cuprac	y =0,0072x +0,0088	0,9984	y = 0,0070x + 0,0058	0,9824	y = 0,0042x + 0,0006	0,9999
TFC/DPPH	y=3312,7x-9,5462	0,9966	y=1442,4x+7,8275	0,9739	y=971,93x + 4,9177	0,9852
TFC/TEAC	y= 3601,7x-2,3123	0,9880	y= 3227,7x - 6,0409	0,9822	y = 1575,2x - 1,6908	0,9999
TFC/Cuprac	y = 4,7017x + 0,0165	0,9996	y = 3,263x + 0,0262	0,9720	y=2,2889x+0,0061	0,9999
TFC/Frap	y=22,658x-0,2508	0,9958	y= 8,3224x + 0,2132	0,8574	y= 10,356x + 0,1584	0,9914

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

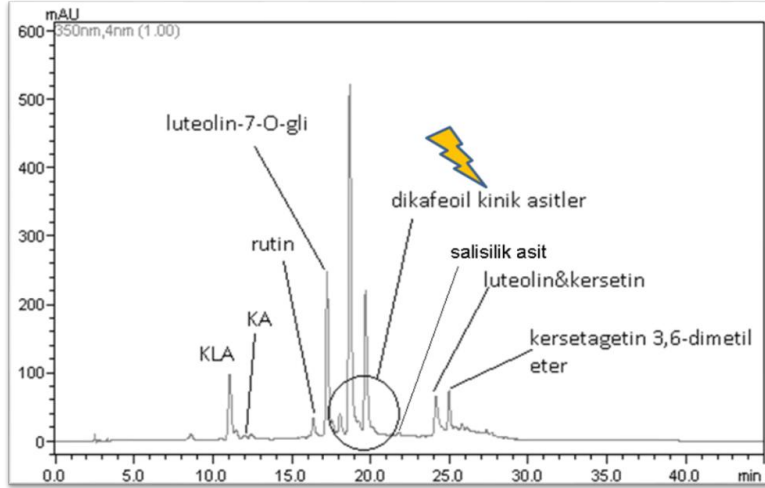
Tıbbi bir bitki olan *A. millefolium* bitkisinden hazırlanan metanol ekstresinden flavonoidlerden rutin, luteolin 7-O-glikozit, luteolin 4'-O-glikozit, apigenin 7-O-glikozit, apigenin 4'-O-glikozit, fenolik asitlerden ise klorojenik asit, 1,3-dikafeoilkinik asit, 1,4-dikafeoilkinik asit, 3,4-dikafeoilkinik asit ve 3,5-dikafeoilkinik asit semipreperatif HPLC ile izole edilmiş ve yapıları NMR ve spektral yöntemlerle aydınlatılmıştır (Vitalini ve ark., 2011). Portekiz'de yapılan bir çalışmada *A. millefolium* bitkisinin metanol ekstresinin DPPH radikali süpürücü kapasitesi incelenmiş ve sonuçlar Slovenya, Litvanya ve Türkiye'de yapılan çalışmalarla kıyaslanmıştır; buna göre bu ülkelere nazaran bitkinin daha düşük DPPH radikalini süpürdüğü, bunun da bitkinin yetiştiği toprak, ülkeler arası hava durumu farklılıkları gibi sebeplerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Dias ve ark., 2013). Başka bir çalışmada *A. millefolium* bitkisinin içerdiği fenolik bileşikler katı faz ekstraksiyonu yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle incelenmiştir ve bitkide bulunan dikafeoilkinik asitlerin koleretik ve flavonoidlerin ise antispazmodik etki gösterdiği saptanmıştır (Benedek ve ark., 2006). *A. millefolium* bitkisinden % 40 etanolle maserasyon yöntemiyle elde edilen ekstrenin içerdiği major fenolik bileşiklerin HPLC ile kalitatif ve kantitatif analizleri yapılan başka bir çalışmada bitkinin rutin, luteolin 7-O glikozit, luteolin, klorojenik asit ve apigenin içerdiği bulunmuştur (Trumbeckaite ve ark., 2011). *A. millefolium* bitkisi üzerine tandem MS yöntemi kullanılarak bir çalışma yapılmış ve bitkinin 1-kafeoilkinik asit, 3 kafeoilkinik asit, 4 kafeoilkinik asit, 5 kafeoilkinik asit, 5-feruoilkinik asit, 1,5-/3,5-/3,4-/4,5-di kafeoilkinik asit ve 1-kafeoil 3-feruoil kinik asit içerdiği bulunmuştur (Jaiswal ve ark., 2011). Başka bir çalışmada *A. millefolium* bitkisinin metanol ekstresinde apigenin, luteolin, klorojenik asit, apigenin heksoz, luteolin heksoz, kersetin heksoz, dikafeoilkinik asit içerdiği ve rutin ya da luteolin diglikozit olduğu düşünülen yapılar ESI-MS ile belirlenmiştir ve bu metanol ekstresinin vazoprotektif etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (Dall'Acqua ve ark., 2011). *A. collina* bitkisinin yaprak ve gövdelerinden hazırlanan metanol ekstresinde 5-O-kafeoilkinik asit (klorojenik asit), 3,5 ve 4,5 di-O-kafeoilkinik asit preparatif HPLC ile izole edilmiş yapıları NMR ve ESI-MS ile aydınlatılmıştır (Giorgi ve ark., 2009).

A. grandifolia bitkisi üzerine yapılan literatür taramasında 3 çalışmaya rastlandı; *A. grandifolia* bitkisinin uçucu yağında majör bileşik olarak askaridol (% 15,5), kamfor (% 15,6), borneol (% 5,2), tuyon ve 1,8-sineol bulunmuştur (Radulovic ve ark., 2010; Hanlidou ve ark., 1992). Diğer bir çalışmada *A. grandifolia* bitkisinin yaprak ve gövde kısımlarının aseton ekstratlarından 6-hidroksiflavon ve 6-hidroksiflavonol'un metil eter aglikonları izole edilmiş ve spektral yöntemlerle yapılarının aydınlatıldığı görülmüştür (Wollenweber ve ark., 1986). *A. grandifolia* bitkisi üzerine yukarıda belirtilen bu çalışmaların dışında herhangi bir literatür bilgisine rastlanılmamıştır. Bu çalışmada ise bitkinin yaprak, gövde ve çiçeğiyle farklı ekstraksiyon yöntemleri (maserasyon, soxhlet, ASE) kullanılarak hazırlanan metanol, etanol, etil asetat ve aseton ekstratlarının içerdiği fenolik bileşikler HPLC-DAD ve LC-QTOF/MS yöntemleri ile analiz edildi.

Bitkide bulunan fenolik bileşikler standart maddelerin HPLC-DAD ile elde edilen kromatogram ve spektrumları yardımıyla tanımlanarak LC/MS-MS yöntemiyle de her bir standartın verdiği fragmentlerin kütlelerine bakılarak konfirme edildi. Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarında 18,08, 18,71 ve 19,70. dk'larda görülen piklerin HPLC-DAD ile analizleri sonucu elde edilen spektrumlarının üst üste birer birer karşılaştırıldığı görüldü ve bu sonuç bu bileşiklerin birer yapı izomerisi olduğunu düşündürdü. LC/MS-MS sonuçları ise bu bileşiklerin birer dikaffeoil kinik asit izomerleri olduğunu gösterdi. Bu yapı izomerleri sadece LC/MS-MS yöntemiyle tanımlanarak edildi.



Şekil 5.1 18 ve 19. dk'larda gelen piklerin spektrumlarının kafeik asit ve klorojenik asit standartlarının spektrumları ile üst üste karşılaştırılması



Şekil 5.2 Bitkide bulunan fenolik bileşiklerin kromatogramı

Bitkinin çiçek kısmında, kersetagetin 3,6-dimetil eter, luteolin-7-O-glikozit, rutin, luteolin, kafeik asit ve klorojenik asit; yaprağında kersetagetin 3,6-dimetil eter, luteolin-7-O-glikozit, rutin, kersetin, kafeik asit ve klorojenik asit; gövdesinde ise, klorojenik asit ve salisilik asit bulundu. Salisilik asit tıbbi bir bitki olan *A. millefolium* dışında ilk kez bu *Achillea* türünde bulundu ve halk arasında *Achillea* türü bitkilerin ağrı kesici olarak kullanılmasının nedeninin salisilik asit içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 5.1 Bitkinin farklı kısımlarında bulunan fenolik bileşikler

Bileşikler	ÇİÇEK	YAPRAK	GÖVDE
Luteolin	+		
Kersetagetin3,6-dimetileter	+	+	
Kersetin		+	
KLA	+	+	+
KA	+	+	
SA			+
Luteolin 7-O-gli	+	+	+
Rutin	+	+	
<u>Di-KQA'ler</u>	+	+	+

A. grandifolia bitkisinin içerdiği glikozit yapılardan rutin ve luteolin 7-O-glikozit varlığını teyit etmek amaçlı bitki asitli ortamda hidroliz edildi. Şekil 4.81-4.91’de görüldüğü üzere 24. dk’larda gelen luteolin ve kersetin aglikonlarının hidroliz sonrası şekerlerinin parçalanmasıyla miktarlarında artış gözlemlendi.

A. grandifolia bitkisinin çiçek, yaprak ve gövde kısımları ile alüminyum(III), kalay(II), demir(II) ve bakır(II) metal tuzları kullanılarak yün boyama yapıldı fakat boyanmış yünlerin asit hidrolizatları HPLC yöntemiyle analiz edildiğinde herhangi bir pike rastlanılmadı. Bu problemin ortaya çıkması bize bu bitkinin direkt boyarmadde kaynağı olabileceğini düşündürdü. Bu tezimizi ispatlamak için metal tuzları kullanılmadan bitkinin öğütülmüş çiçek, gövde ve yaprak kısımları 100 °C’deki su banyosunda yün ile belli bir süre bekletildiğinde bitkinin yünü direkt boyadığı gözlemlendi. Bunun üzerine, direkt boyarmadde kaynağı olduğu anlaşılan bitki kısımlarıyla yün boyamanın gerçekleştirileceği boyama banyosu sıcaklık ve süre açısından spektrofotometrik olarak optimize edildi. Elde edilen sonuçlara göre bitkiden boyarmaddelerin ekstraksiyonu için yeterli sürenin 30 dk, sıcaklığın ise 100 °C olduğu saptandı. Bu koşullarda boyanmış yünlerden boyarmaddelerin DMF ile ekstre edilebilmesi için gerekli süreye ise kromatografik olarak karar verildi. Boyanmış yünlerin HPLC yöntemiyle kalitatif olarak boyarmadde analizleri yapıldı ve bu analizlerin sonucunda kersetin, 3,6-dimetil eter, luteolin-7-O-glikozit, rutin, kersetin, luteolin, kafeik asit ve klorojenik asit içerdiği tespit edildi. Ayrıca bitkinin içerdiği boyarmaddelerin miktarları HPLC’de referans maddelerin kalibrasyon eğrilerinden en küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğru denklemleri kullanılarak kantitatif olarak analiz edildi. Buna göre, bitkinin yaprağında bulunan boyarmaddelerin miktarları 0,0189 µg rutin/mg yaprak, 0,2492 µg luteolin-7-O-glikozit/mg yaprak, 0,1388 µg kersetin/mg yaprak, 0,0198 µg kafeik asit/mg yaprak, 0,0366 µg klorojenik asit/mg yaprak olarak bulundu. Bitkinin çiçeğinde bulunan boyarmaddelerin miktarları 0,0690 µg rutin/mg çiçek, 3,1583 µg luteolin-7-O-glikozit/mg çiçek, 0,4518 µg luteolin/mg çiçek olarak hesaplandı. Bitkinin gövdesinde bulunan boyarmaddelerin miktarları 0,0947 µg luteolin-7-O-glikozit /mg gövde olarak bulundu.

Yapılan bir çalışmada çözücünün polaritesinin bir flavonoid olan kersetinin antioksidan aktivitesi ile ilişkisi incelenmiş; çözücü olarak etanol, metanol ve %10

etanol/su ile hazırlanan kersetin ekstralarının DPPH yöntemiyle antioksidan etkisine bakılmış ve etanolün en yüksek aktivite gösterdiği ve dolayısıyla çözücünün polaritesinin artmasıyla kersetinin aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Bunun sebebi çözücü ile kersetin molekülü arasındaki hidrojen bağının kersetinin hidrojen verme eğilimine göre değişmesi olarak açıklanmıştır (Pinelo ve ark., 2004). Bu çalışmada bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından farklı çözücülerle hazırlanan ekstraların HPLC analizleri incelendiğinde ve çözücü ile aktivite arasındaki ilişki de gözönüne alındığında antioksidan kapasite tayini için en iyi çözücünün etanol olduğuna karar verildi. Bitkinin farklı kısımlarının etanol ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin HPLC yöntemiyle kantitatif analizi yapıldı ve antioksidan kapasite ile fenolik bileşikler arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu tespit edildi. HPLC sonuçlarına göre bitkinin çiçeğinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları 4,565 µg rutin/mg çiçek, 38,655 µg luteolin-7-O-glikozit /mg çiçek, 1,715 µg luteolin /mg çiçek, 0,685 µg klorojenik asit/mg çiçek; yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin miktarları; 1,230 µg luteolin /mg yaprak, 0,705 µg klorojenik asit/mg yaprak; gövdesinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları ise 1,195 µg luteolin-7-O-glikozit /mg gövde, 0,480 µg klorojenik asit/mg gövde olarak hesaplandı.

Bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımları etanol ile maserasyona bırakıldı ve elde edilen ekstraların toplam fenolik miktarları katesine, toplam flavonoid miktarları ise kersetine eşdeğer olarak tayin edildi. Ayrıca ekstraların bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC), demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (FRAP), troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali giderme kapasitesinin tayini ve metal kelatı oluşturma kapasitesi yöntemleri kullanılarak antioksidan kapasiteleri ilk kez kendi aralarında ve standart olarak kullanılan askorbik asit, BHA, BHT ve EDTA ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlara göre bitkinin çiçek kısmı TPC, TFC, CUPRAC, FRAP, DPPH ve metal kelatı oluşturma kapasitesi yöntemlerinde en yüksek, yaprak kısmı ise TEAC yönteminde en yüksek antioksidan kapasite gösterdi. Bunun sebebinin TEAC yönteminin lipofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntem olduğundan, dolayısıyla bitkinin yaprağında bulunan ve polar çözücülerde çözünebilen klorofil b molekülünden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bitkinin içerdiği toplam flavonoid ve fenolik

madde miktarları ile antioksidan kapasite yöntemleri arasındaki korelasyon incelendi. Elde edilen sonuçlara göre FRAP yöntemi ile toplam flavonoid ve fenolik madde arasında düşük korelasyon olduğu tespit edildi. Bunun sebebinin bitkide bulunan fenolik bileşiklerin dışındaki diğer bileşiklerin de demiri indirgeme potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın sonucu olarak bütün antioksidan kapasite tayin yöntemleri karşılaştırıldığında bitkinin özellikle çiçek kısmının sitotoksik etkisi incelendikten sonra doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Ayrıca bu bitki direkt doğal boyarmadde kaynağı olarak kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

Ahmad VU, Farooq U, Hussain J, Farmanullah, Abbasi MA, Jassbi AR, Nawaz SA, Choudhary MI. Three new sesquiterpene Hemiacetals from *Achillea vermicularis*. Nat Prod Res. 2005; 19:6, 551-559.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. J Agr Food Chem. 2004; 52: 7970-7981.

Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 2013; 85: 957–998.

Applequist WL, Moerman DE. Yarrow (*Achillea millefolium*L.): A Neglected panacea A review of ethnobotany, bioactivity, and biomedical research. Econ Bot. 2011; 65: 209–225.

Arabacı T. Türkiye’de Yetişen *Achillea* L. (Asteraceae) Cinsinin Revizyonu. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, Malatya, 2006, (Danışmanlar: Prof. Dr. Bayram Yıldız, Yrd. Doç. Dr. Emel Yiğit).

Augusto O, Miyamoto S. Oxygen radicals and related species: General aspects of the reactivity of oneand two-electron oxidants. In: eds. Pantopoulos K, Schipper HM. Principles of Free Radical Biomedicine. 1st ed. Nova Science Publishers; 2011, p: 7-10.

Azeez FA, Adaramoye OA. Evaluation of antioxidant and acteylcholinesterase-inhibitory properties of methanol extracts of nauclealatifolia, Cymbopogon citratus and Cocos nucifera: An in vitro study. Brit J of Med&Med Res. 2014; 11:2156-2170.

Decker EA. Antioxidant mechanisms. In: eds. Akoh CC, Min DB. Food Lipids: Chem, Nutr and Biotech. Third ed. CRC Press USA; 2008, 409-412.

Bağcı E, Koçak A, Yüce E. *Achillea wilhelmsii* C. Koch ve *Achillea schischkinii* Sosn. Türlerinin Uçucu Yağ Kompozisyonu. Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi. 2008; 20 (2): 251-255.

Bakır C, Özmen H. Anason (*Pimpinella anisum*) ve rezene (*Foeniculum vulgare*) tohumlarında antioksidan aktivitelerinin tayini. NWSA. 2012; 7(2): 49-54.

Barbusinski K. Fenton reaction. Controversy concerning the chemistry. Ecol Chem and Eng S. 2009; 16(3): 347-358.

Bashi DS, Fazly Bazzaz BS, Sahebkar A, Karimkhani MM, Ahmadi A. Investigation of optimal extraction, antioxidant, and antimicrobial activities of *Achillea biebersteinii* and *A. wilhelmsii*. Pharm Biol. 2012; 50(9): 1168-1176.

Baskin S, Salem H. Oksidant, antioksidantlar ve serbest radikaller. 1 ed. CRC Press; 1997, p: 5-6.

Başer İ, İnancı Y. Boyarmadde Kimyası. Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Yayını, No:2 İstanbul, 1990; 47-52.

Benedek B, Geisz N, Jager W, Thalhammer T, Kopp B. Choleric effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in the isolated perfused rat liver. Phytomedicine. 2006; 13:702-706.

Bener M, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods. Ind Crops and Prod. 2010; 32: 499-506.

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: The FRAP assay. Anal Biochem. 1996; 239:70-6.

Büyüktuncel E. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. Marmara Pharm J. 2013; 17: 93-103.

Blay G, Cardona L, Garcia B, Lahoz L, Monje B, Pedro JR. Synthesis of 3-Oxaguanolides from Santonin. Tetrahedron. 2000; 34: 6331-6338.

Bruno M, Rosselli S, Raccuglia RA, Maggio A, Senatore F, Arnold NA. Terpenoids and flavones from *Achillea falcate* (Asteracea). Rev Soc Quim Mex. 2003; 47:2, 130-131.

Candan F, Unlu M, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, Akpulat Ha. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). J Ethnopharmacol. 2003;87(2-3): 215-220.

Cardon D. Natural Dyes - Sources, Tradition. Technology and Science. Archetype Publications Ltd., London, 2007, 187-188, 485, 668- 679.

Clifford MN, Weiguo W, Kuhnert N. The chlorogenic acids of Hemerocallis. Food Chem. 2006; 95: 574–578.

Charles DJ. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. New York: Springer; 2013, 495-501.

Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutr Biochem. 1996; 7, 66-76.

Cooksey CJ. An annotated bibliography of recent significant publications on indigo and related compounds. Biotech Histochem. 2012; 87(7): 439-463.

Çakalgöz SY, Eltez S. *Ceroplastes rusci* L. (Hemiptera: Coccidae) dişi bireylerinin kabuklarından antik dönemlerde kullanılan boya çıkarma yöntemleri ile boya eldesi. Pamukkale Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi Sayı. 2014;17: 39-44.

Çalışır ZE, Çalışkan D. Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. Ankara Ecz. Fak. Derg. 2003; 32(3): 193-207.

Dall'Acqua S¹, Bolego C, Cignarella A, Gaion RM, Innocenti G. Phytomedicine. 2011 15;18(12):1031-6. Vasoprotective activity of standardized *Achillea millefolium* extract.

Demirbağ Ç, Seyhan SA, Dölen E. *Rapana venosa*'da bulunan indigoid boyarmaddelerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyod-sıralı dedektör (HPLC-DAD) ile belirlenmesi. Marmara Pharm J. 2014; 18: 177-181.

Demirci F, Demirci B, Gürbüz İ, Yeşilada E, Başer CH. Characterization and biological activity of *Achillea teretifolia* Willd. and *A. nobilis* L. subsp. *neilreichii* (Kerner) Formanek Essential Oils. Turk J Biol. 2009; 33: 129-136.

Dias MI, Barros L, Duenas M, Pereira E, Carvalho AM, Alves RC, Oliveira MB, Santos-Buelga C, Ferreira IC. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. Food Chemistry 2013; 141(4): 4152-4160.

Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salycilate and 5-aminosalycilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Arch Biochem Biophys. 1994; 315: 161-169.

Dölen E. Tekstil tarihi-Dünyada ve Türkiye' de tekstil teknolojisinin ve sanayiinin tarihsel gelişimi. Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Yayınları (92/1), İstanbul, 1992, 469- 515.

Enez N. Doğal Boyamacılık. Marmara Ün. Güzel Sanatlar Fak. Yayını, İstanbul, 1987, 1-21.

Erdik E, İhsaoglu E, Obalı M, Öktemer A, Pekel T, Yüksekışık N. Denel Organik Kimya. 3. Baskı, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2000, 631-632.

Erdik E, Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Gazi kitabevi. 5. Baskı. Ankara, 1993.386-407.

Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. Nutr. Res. 2004; 24: 851-874.

Ertaş A, Boğa M, Haşimi N, Yeşil Y, Gören CA, Topçu G, Kolak U. Antioxidant, anticholinesterase, and antimicrobial activities and fatty acid constituents of *Achillea cappadocica* Hausskn. et Bornm. Turk J Chem. 2014; 38: 592-599.

Fessenden RJ, Fessenden JS, Logue MW. Organik Kimya. Güneş Kitabevi, Çeviri Editörü: Tahsin Uyar. 1st ed. Ankara, 2001, 889-896.

Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of *Citrus* juices. Molecules. 2007; 12(8), 1641-1673.

Gawrys JO, Surowiec I, Kehl J, Rejniak H, Walczak KU, Trojanowicz M. Identification of natural dyes in archeological Coptic textiles by liquid chromatography with diode array detection. J Chromatogr A. 2003; 989(2003):239-248.

Giorgi A, Mingozi M, Madeo M, Speranza G, Cocucci M. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). Food Chem. 2009; 114 (1): 204–211.

Giridhari L, Manasi M. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Butea Frondosa* Roxb. Flower. Pharmacog J. 2011; 21: 65.

Ghantous A, Nasser N, Saab I, Darwiche N, Saliba NA. Structure–activity relationship of seco-tanaparthalides isolated from *Achillea falcata* for inhibition of HaCaT cell growth. Eur J Med Chem. 2009; 44: 3794-3797.

Glasl S, Mucaji P, Werner I, Presser A, Jurenitsch J. Sesquiterpenes and flavonoid aglycones from a hungarian taxon of the *Achillea millefolium* Group. Z. Naturforsch. 2002; 57: 976-982.

Haidara K, Zamir L, Shi QW, Batist G. The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. Cancer Lett. 2006; 242(2): 180-190.

Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in disease. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. 2001.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012; 70(5): 257-265.

Halpine, S.M. (1996), "An improved dye and lake pigment analysis method for high-performance liquid chromatography and diode-array detector", *Stud. Conserv.*, Vol. 41 No. 2, pp. 76-94.

Hanlidou, E, Kokkalou E, Kokkini S. Volatile constituents of *Achillea grandifolia*. *Planta Medica.* 1992; 58: 105-107.

Harmandar M, Bilaloğlu GV. Flavonoidler. *Aktif yayınevi*, 1.Baskı. İstanbul, 2006, 11-12.

Helle RA, Jesper BN, Fleming N. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemist.* 1997; 43: 562-568.

Huang D, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem.* 2005; 53:1841- 1856.

Issabeagloo E, Taghizadieh M, Abri B. Antimicrobial effects of yarrow (*Achillea millefolium*) essential oils against *Staphylococcus* species. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2012; 41: 2895-2899.

Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry.* 2011; 72 (8): 781-90.

Kahraman A. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi.* 2002; 3: 01-08.

Karamenderes C, Apaydin Ş. Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. Schwarz) Bassier on the rat isolated duodenum. *J Ethnopharmacol.* 2003; 84: 175-179.

Karadal F, Yıldırım Y. Balın kalite nitelikleri, beslenme ve sağlık açısından önemi. *Erciyes Üniv Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2012; 9(3): 197-209.

Karamanoğlu K. Farmasötik Botanik Ders Kitabı. Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, 2.Baskı. Ankara, 1977, 397-400.

Karapanagiotis I, Tsakalof A, Chryssoulakis Y. Identification of red natural dyes in post-byzantine icons by HPLC. J Liq Chromatogr & Rel Technol. 2005; 28: 739–749.

Kareem OB, Alawi MA, Mubarak MS. Identification of natural dyes in selected museum textiles using high performance liquid chromatography with photodiode arraydetection (HPLC-PDA). RJTA. 2011; 15(2): 84-94.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol. 2011; 48: 412–422.

Kiumarsi A, Abomahboub R, Rashedi SM, Parvinzadeh M. *Achillea millefolium*, a New Source of Natural Dye for Wool Dyeing. Prog. Color Colorants Coat. 2009; 2: 87-93.

Koca N, Karadeniz F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. Gıda Mühendisliği Dergisi. 2003;16: 32-37.

Kocevar N, Glavac I, Injac R, Kreft S. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. J Pharm and Biomed Anal. 2008; 46(13): 609-614.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol. 2002; 30 (6): 620-650.

Kopani M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. Oxidative stress and electron spin resonance. Clin Chim Acta. 2006; 364: 61-66.

Koppenol WH. Names for inorganic radicals (IUPAC Recommendations 2000). Pure and Appl Chem. 2000; 72: 437-446.

Krenn L, Miron A, Pemp E, Petr U, Kopp B. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. Naturforsch. 2003; 58: 1-2.

Lakhanpal P, Kumar D. Quercetin: A Versatile flavonoid. IJMU. 2007; 2(2): 22-37.

Lallemand L, Mccarthy A, Mccarthy J. Production of chlorogenic and dactylifric acid species. International application published under the patent cooperation treaty (PCT), patent numarası: WO 2012/126789 A1. 2012;1-93.

Lech K, Jarosz M. Novel methodology for the extraction and identification of natural dyestuffs in historical textiles by HPLC–UV–Vis ESI MS. Case study: chasubles from theWawel Cathedral collection. Anal Bioanal Chem. 2011; 399: 3241-3251.

Lieberman M, Marks AD. Basic medical biochemistry a clinical approach. 3rd ed. China: Lippincott Williams & Wilkins; 2009; 443-462.

Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G, Lupidi G, Papa F, Quassinti L, Sagratini G, Vittori S. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: ideal candidate for anti-cariogenic formulations. Fitoterapia. 2009;80(6):313-319.

Mahmoud AA, Shihry SSA, Hegazy MEF. A New epimeric sesquiterpene lactone from *Achillea ligustica*. Rec. Nat. Prod. 2012; 6(1): 21-27.

Manhita A, Ferreira T, Candeias A, Dias CB. Extracting natural dyes from wool--an evaluation of extraction methods. Anal Bioanal Chem. 2011; 400(5): 1501-1514.

Mantzouris D, Karapanagiotis I, Panayiotou C. Comparison of extraction methods for the analysis of *Indigofera tinctoria* and *Carthamus tinctorius* in textiles by high performance liquid chromatography. Microchem J. 2014; 115: 78–86.

Marais JPJ, Deavours B, Dixon RA, Ferreira D. The Stereochemistry of flavonoids. In: ed.Grotewold E. The Science of flavonoids. Springer. 2006; 1-2.

Marchart E, Kopp B. Capillary electrophoretic separation and quantification of flavone-O- and C-glycosides in *Achillea setacea* W. et K. J Chromatogr B. 2003; 792(2): 363-368.

Meriçli AH. *Cynara* (enginar) türlerinin kimyasal bileşikleri ve farmakolojik etkileri. Pharmacia-JTPA. 1989; 29(63): 22-25.

Mert H, Başlar S. Çevre sorunları yönünden bitkisel boyaların önemi. II. Uluslararası Ekoloji ve Çevre Sorunları Sempozyumu, Ankara, 1992.

Montanari T, Carvalho JE, Dolder H. Antispermatogetic effect of *Achillea millefolium* L. in mice. Contraception. 1998; 58(5): 309-313.

Morales YE, Reyes J, Hermosín B, Azamar-Barrios JA. Characterization of a natural dye by spectroscopic and chromatographic techniques. Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 2012; 1374.

Niki E. Free radicals in chemistry and biochemistry. In: eds. Hiramatsu M, Yoshikawa T, Inoue M. Food and Free Radicals. Plenum Press, New York, 1997;1-8.

Nizamlıoğlu NM, Nas S. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler yapıları ve önemleri. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2010; 5: 20-35.

Ndhlala AR, Moyo M, Staden JV. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? Molecules. 2010; 15: 6905-6930.

Moradkhani S, Ayatollahi AM, Ghanadian M, Moin MR, Razavizadeh M, Shahlaei M. Phytochemical analysis and metal-chelation activity of *Achillea tenuifolia* Lam. Iran J Pharm Res. 2012; 11: 177-83.

Oliveira S, Souza GA, Eckert CR, Silva TA, Sobral ES, Fávero OA. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quimica Nova*. 2014; 37: 497-503.

Ölmez F. Yün halı ipliklerinin fındık (*Corylus avellana* L.) yaprakları ile boyanmasından elde edilen renkler ve bazı haslık değerleri. *Yüzüncü Yıl Üniv.Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Dergisi*. 2005; 15 (1): 77-84.

Özmen OA. Tokat çevresinde geleneksel tedavi amacıyla kullanılan bazı bitki karışımlarının optimum antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tokat, 2010 (Danışman: Doç.Dr. Ramazan Erenler).

Öztürk M. *Micromeria cilicica* ve *M. juliana* türlerinde antioksidan bileşiklerin hplc ile analizi ve yapılarının aydınlatılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2008 (Danışman: Doç.Dr. Ufuk Kolak)

Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Başkan KS, Erçağ E, Çelik SE. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Methods*. 2011; 3: 2439-2453.

Padmanabhan P, Jangle SN. Evaluation of dpph radical scavenging activity and reducing power of four selected medicinal plants and their combinations. *Int J Pharm Sci Drug Res*. 2012; 4(2): 143-146.

Peggie DA, Hulme AN, McNab H, Quye A. Towards the identification of characteristic minor components from textiles dyed with weld (*Reseda luteola* L.) and those dyed with Mexican cochineal (*Dactylopius coccus* Costa). *Microchim Acta*. 2008; 162 (3-4): 371-380.

Percival M. Antioxidants. *Clin Nutr Insights*. 1998; 1(96): 1-4.

Perrone D, Farah A, Donangelo CM, Paulis T, Martin P. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chem*. 2008; 106: 859-867.

Pinelo M, Manzocco L, Nunez MJ, Nicoli MC. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chem.* 2004; 88: 201-207.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4(2): 89-96.

Plazonic A, Buca F, Males Z, Mornar A, Nigovic B, Kujundzic N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules.* 2009; 14: 2466-2490.

Psotova J. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers.* 2003; 147(2): 147-153.

Radulovic NS, Blagojevic PD, Skropeta D, Zarubica AR, Zlatkovic BK, Palic RM. Misidentification of tansy, *Tanacetum macrophyllum*, as yarrow, *Achillea grandifolia*: a health risk or benefit? *Nat Prod Commun.* 2010; 5(1):121-7.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 1231-1237.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997; 2: 152-159.

Rijken PJ, Wiseman SA, Weisgerber UM, Mierlo CAJ, Quinlan PT, Put F. Antioxidant and other properties of green and black tea. In: eds. Cadenas E, Packer L. *Handbook of Antioxidants.* second ed. revised and expanded, New York -Base; 2005, 371-379.

Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Goojer C, Brinkman UA. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A.* 2006; 1112(1-2): 31-63.

Robbins R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 2003; 51: 2866-2887.

Rodríguez ES, Rodríguez AA, García Rodríguez MA, Egido M, Cámara C. Identification of natural dyes in historical coptic textiles from the national archaeological museum of Spain. *E-Conservation Magazine.* 2010;15: 32-4.

Saeidnia S, Gohari AR, Mokhber DN, Kiuchi F. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. *DARU J Pharm Sci.* 2011; 19(3): 173-186.

Samatha T, Shyamsundarachary R, Srinivas P, Swamy NR. Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of *Oroxylum indicum* L. Kurz. *Asian J Pharm and Clin Res.* 2012; 5(4): 177-179.

Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Int Pharm Sci.* 2011; 1(1): 25-41.

Santos J, Bispo VS, Filho ABC, Pinto IFD, Dantas LS, Vasconcelos DF. Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of coconut water (*Cocos nucifera* L.) and caffeic acid in cell culture. *An Acad Bras Cien.* 2013; 85(4): 1235-1246.

Singh PP, Mahadi F, Roy A, Sharma P. Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of *Diabetes mellitus* type-2. *Indian J Clin Biochem.* 2009; 24 (4): 324-342.

Sökmen A, Sökmen M, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Unlü M, Akpulat HA. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae). *Phytother Res.* 2004;18(6): 451-456.

Surowiec I, Gawrys JO, Biesaga M, Trojanowicz M, Hutta M, Halko R, Walczak KU. Identification of natural dyestuff in archeological coptic textiles by HPLC with Fluorescence Detection. *Anal Lett.* 2003; 36(6):1211-1229.

Surowiec I, Quye A, Trojanowicz M. Liquid chromatography determination of natural dyes in extracts from historical Scottish textiles excavated from peat bogs. J Chromatogr A. 2006; 1112(1-2): 209-217.

Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure- activity relationship. J. Agric. Food Chem. 2002; 50:468–472.

Schütz K, Kammerer DR, Carle R, Schieber A. Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* Web. ex Wigg) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005; 19:179-186.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Enstrümantal Analiz İlkeleri. Çeviri Editörü: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H., Bilim Yayıncılık, 5. Baskı. Ankara, 1998; 511-534.

Szollosi SR, Varga IS. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). Acta Biologica. 2002; 46: 125-127.

Şahin Saliha. Türkiye’de yetişen *Prunella* L. türlerinin fenolik bileşikleri ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesinde analitik metotlar. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011, Bursa (Danışman: Prof. Dr. Cevdet Demir).

Tanker N, Koyuncu M, Çoşkun M. Farmasötik Botanik, Ankara Üniv. Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2007; 93:313-319.

Tepe B, Eminagaoglu O, Akpulat HA, Aydın E. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. Food Chem. 2007; 100: 985-989.

Tuncel NB, Yılmaz N. Kaz Dağları’ndan Toplanan Bazı Bitkilerin Fenolik Asit

Kompozisyonlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi. Akademik Gıda. 2010; 8 (3):18-23.

Turkoglu İ, Turkoglu S, Celik S, Kahyaoglu M. Antioxidant and antimicrobial activities of Turkish endemic *Achillea* species. African J Microbiol Res. 2010; 19: 2034-2042.

Tutak M, Benli H. Bazı bitkilerden elde edilen doğal boyar maddelerin yünü boyama özelliğinin incelenmesi. BAÜ, FBE Dergisi. 2008;10(2): 53-59.

Todorova MN, Krasteva ML, Markova MM, Tsankova ET, Taskova RM, Peev DR. Terpenoids from *Achillea clypeolata*. Phytochem. 1998; 49(8): 2371-2374.

Todorova M, Trendafilova A, Mikhova B, Vitkova A, Duddeck H. Terpenoids from *Achillea distans* Waldst. & Kit. Ex Willd. Biochem Sys Ecol. 2007; 35: 852-858.

Trifunovic S, Aljancic I, Vajs V, Macura S, Milosavljevic. Sesquiterpene lactones and flavonoids of *Achillea depressa*. Biochem Sys Ecol. 2004; 33: 317-322.

Trifunovic S, Vajs V, Juranić Z, Zizak Z, Tesević V, Macura S, Milosavljević S. Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro. Phytochem. 2006; 67:887-893.

Trumbeckaite S, Benetis R, Bumblauskiene L, Burdulis D, Janulis V, Toleikis A, Viškelis P, Jakštas V. *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. Food Chemistry 2011; 127: 1540– 1548.

Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2010; 2:1231-1246.

Vermerris W, Nicholson R. Families of phenolic compounds and means of classification. In: eds. Vermerris W, Nicholson R. Phenolic compound biochemistry. The Netherlands: Springer. 2006; 1-2.

Vetschera KMV, Wollenweber E. Leaf exudate flavonoids of *Achillea sibirica* subsp. *mongolica* and *A. latiloba* (Compositae-Anthemideae). *Biochem Sys Ecol.* 1999; 27:523-525.

Vieira LM, Kijjoa A, Pereira J, Gedris TE, Herz W. Germacranes and flavonoids from *Achillea ageratum*. *Phytochem (Oxford)*. 1997; 45(1): 111-115.

Vitalini S, Beretta G, Iriti M, Orsenigo S, Basilico N, Dall'Acqua S, Iorizzi M, Fico G. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. *Acta Biochimica Polonica*. 2011. 58, 203–212.

Yağcı C, Toker MC, Toker G. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 2008; 1: 47-58.

Yerer B, Aydoğan S. Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimler Dergisi*. 2000; 9(1): 49-53.

Yıldız H, Baysal T. Bitkisel fenoliklerin kullanım olanakları ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*. 2010; 29-35.

Yurdun T, Karadağ R, Dölen E, Mubarak Ms. Identification of natural yellow, blue, green and black dyes in 15th–17th centuries Ottoman silk and wool textiles by HPLC with diode array detection. *Rev Anal Chem*. 2011; 30(3):153-164.

Zhang X. Analysis of natural yellow dyes using Hplc with diode array and mass spectrometric detection Fudan University, Doctor thesis, 2001. China.

Wang CC, Chu CY, Chu KO, Choy KW, Khaw KS. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin Chem*. 2004; 50: 952-954.

Wollenweber E, Vetschera KMV, Ivancheva S, Kuzmanov B. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some *Achillea* species. *Phytochem*. 1986; 26(1): 181-182.

Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem*. 2007; 105: 940–949.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Duygu	Soyadı	Taşkın
Doğum Yeri	Kadıköy	Doğum Tarihi	20/11/1985
Uyruğu	T.C.	Tel	+905330380433
E-mail	duygu.susuz@yeniuyuzyl.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi	2010
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2007
Lise	Mehmet Niyazi Altuğ Lisesi	1999

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Öğr. Gör.	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2011-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	71,250							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71	75	77

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	Çok iyi

Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

Susuz D., Dölen E. (2011). Development of an RP-HPLC Method for the Analysis of Flavonoids in *Achillea biebersteinii* Afan. and Investigation of Wool Dyeing, *Dyes in History and Archaeology* (DHA 30) 13-15 October 2011. Derby, UK. Poster number: P:52.

Susuz D., Dölen E. (2012). Qualitative Analysis of Flavonoids in *Achillea biebersteinii* Afan. by RP HPLC-DAD. *10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*. Ankara, İstanbul.

Taşkın D, Çakır, G, Sungur, S (2014). Spectrophotometric Determination of Butamirate citrate in Pure Form and Pharmaceutical Formulation by Ion–Pair Extraction using Methyl Orange. *2nd International Conference On Global Trends In Pure And Applied Chemical Sciences*. 3-4 October 2014, Hong Kong. Poster number: pp:56

Taşkın D, Alkaya B. D, Dölen E (2014). HPLC-DAD Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Achillea grandifolia* Friv. 23 Silae 7-12 September 2014. Italy. Poster number: P-277, pp:170.

Taşkın D, Çakır, G, Sungur, S (2014). A Validated Spectrophotometric Determination of Butamirate Citrate in Bulk and Dosage Forms using Bromothymol Blue as Ion-Pair Reagent. 23 Silae 2014, İtalia. Poster number: P-162, pp:57.

Gizem Çakır, **Duygu Taşkın**, Sıdıka Sungur (2014). Spectrophotometric Determination of Formoterol Fumarate in Pure Form and Pharmaceutical Preparations. *4th International Meeting on Pharmacy & Pharmaceutical Science (IMPPS-4)*. 18-21 September 2014, İstanbul. Poster number: P-143, pp:152.

İdari Görevler

Yeni Yüzyıl Üniv. Ecz. Fak. Erasmus Koordinatörlüğü (2012-)

Sertifikalar:

- English for Specific Purposes Course In Conservation Science (2011). Marmara Üniversitesi.
- 4th Residential Summer School on Conservation Science (2010). *Katılımcı*, Aragon Enstitüsü, Zaragoza, İspanya.
- 5th Residential Summer School on Conservation Science (2011). *Katılımcı*, Marmara Üniversitesi.
- Instrumental Techniques for the Conservation of Cultural Heritage (2010). Verona Üniversitesi, Teruel, İspanya.
- General Chemistry II (2010) Aristoteles Üniversitesi, Yunanistan.