

YABANİ *PRUNUS*, *SORBUS* VE *DIOSPYROS* TÜRLERİNDE BAZI
FENOLİK MADDELERİN TAYİNİ VE YENİ BİR ANTIOKSİDAN
KAPASİTE TAYİN METODUNUN (CHROMAC) GELİŞTİRİLMESİ

ESRA IŞIK



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YABANİ *PRUNUS*, *SORBUS* VE *DIOSPYROS* TÜRLERİNDE BAZI FENOLİK
MADDELERİN TAYİNİ VE YENİ BİR ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN
METODUNUN (CHROMAC) GELİŞTİRİLMESİ**

Esra IŞIK

Prof. Dr. Belgin İZGİ

(Danışman)

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2017

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Esra IŞIK tarafından hazırlanan “Yabani *Prunus*, *Sorbus* ve *Diospyros* Türlerinde Bazı Fenolik Maddelerin Tayini ve Yeni Bir Antioksidan Kapasite Tayin Metodunun (CHROMAC) Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Belgin İZGİ

Başkan : Prof. Dr. Belgin İZGİ
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Hulusi MALYER
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Doç. Dr. Elif TÜMAY ÖZER
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı

İmza

Üye : Doç. Dr. Sema BAĞDAT
Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı

İmza

Üye : Doç. Dr. Ömer KOZ
Bursa Teknik Üniversitesi Doğa Bilimleri,
Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

27/04/2017

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

27/04/2017

Esra IŞIK

ÖZET

Doktora Tezi

YABANI *PRUNUS*, *SORBUS* VE *DIOSPYROS* TÜRLERİNDE BAZI FENOLİK MADDELERİN TAYİNİ VE YENİ BİR ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN METODUNUN (CHROMAC) GELİŞTİRİLMESİ

Esra IŞIK

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Belgin İZGİ

Bu tez kapsamında elektron transfer metoduna dayanan ve literatürde yaygın olarak kullanılan antioksidan kapasite tayin metotlarına alternatif olabilecek yeni bir antioksidan kapasite tayin metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen Cr(VI) antioksidan kapasite tayin (CHROMAC) metodu Cr(VI)'nın asidik ortamda organik maddeleri yükseltgeme ve 1,5-difenilkarbazid ile kararlı diaquabis (1,5-difenilkarbazon) krom(III) kompleksi oluşturma özelliğine dayanır. Materyallerin ve standart maddelerin antioksidan kapasite değerlerinin CHROMAC metoduyla tayin edilebilmesi için ortamın pH/E⁰ değeri (pH= 2,8/E⁰=0,95V), Cr(VI)'nın 1,5-difenilkarbazid ile girdiği reaksiyondaki mol oranı (1:1), reaksiyon süresi (50 dakika), fenolik maddeler için doğrusal çalışma aralığının ($6,0 \times 10^{-5}$ - $4,5 \times 10^{-4}$ mol/L) ve girişim etkilerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Aynı zamanda geliştirilen CHROMAC metodunun doğal örneklerle uygulanabilirliği incelenmiştir. Standart maddeler ile yapılan çalışmalarla metodun TEAC değeri ABTS ve CUPRAC metotlarıyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca Bursa'da doğal olarak yetişen *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., türlerinin meyveleri için ultrasonik ve çözücü ekstraksiyonları (asidik, bazik, asidik-bazik ve enzimatik) uygulanarak örnek hazırlama teknikleri geliştirilmiş ve bu meyvelerde bulunan fenolik maddeler, kantitatif olarak HPLC-DAD ile belirlenmiştir. Yabani meyvelerin antioksidan kapasite değerleri ABTS, CUPRAC ve CHROMAC metotları ile belirlenerek elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., HPLC, CHROMAC, antioksidan kapasite, ABTS, CUPRAC. **2017, 114 + xii sayfa**

ABSTRACT

PhD Thesis

DETERMINATION OF SOME PHENOLIC COMPOUNDS IN WILD *PRUNUS*, *SORBUS*, *DIOSPYROS* AND DEVELOPMENT OF A NEW ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION METHOD (CHROMAC)

Esra IŞIK

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Belgin İZGİ

In this thesis, based on electron transfer and a novel antioxidant capacity method, Cr (VI) antioxidant capacity (CHROMAC) method, which may be an alternative to widely used antioxidant capacity determination methods available in the literature, has been developed. The developed Cr(VI) antioxidant capacity (CHROMAC) method is based on the property of Cr (VI) to oxidize the organic materials in the acidic medium and to form the stable diaquabis (1,5-diphenylcarbazone) chromium (III) complex with 1,5-diphenylcarbazide. To determination of antioxidant capacity values of samples and standards with CHROMAC method, the working conditions need to be in proper pH/E⁰ ratio. For this purpose of developing CHROMAC method experimental studies is performed with determine of the pH/E⁰ (pH=2,8/E⁰=0,95V) value of the medium, the molar ratio of Cr (VI) to the reactant with 1,5-diphenylcarbazide (1:1), the reaction time (50 minutes), the linear working range for phenolic substances ($6,0 \times 10^{-5}$ - $4,5 \times 10^{-4}$ mol/L) and interference effect. At the same time the applicability of the CHROMAC method to natural samples has been examined. The mentioned developed method TEAC values was compared with at worked method of ABTS and CUPRAC via standards. In addition, sample preparation techniques were developed by applying ultrasonic and solvent extractions (acidic, basic, acidic-basic and enzymatic) for the fruits of naturally grown of *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*, *Diospyros lotus* L. wild fruit species in Bursa and the phenolic materials present in these fruits were quantitatively determined by HPLC-DAD. Antioxidant capacity values of wild fruits were determined by ABTS, CUPRAC and CHROMAC methods and the results obtained were compared.

Anahtar Kelimeler: *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., HPLC, CHROMAC, antioxidant capacity, ABTS, CUPRAC. **2017, 114+ xii pages**

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez kapsamında yapılan spektroskopik ve kromatografik çalışmalar Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Kromatografi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Bu tezin tüm deneysel çalışmaları ilk tez danışmanım Prof. Dr. Cevdet DEMİR danışmanlığında yürütülmüştür. Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, hocam Prof. Dr. Cevdet DEMİR' e teşekkürlerimi sunarım.

Tez gelişme döneminde beni sabırla dinleyen, beni yalnız bırakmayıp desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Belgin İZGİ' ye

Tez izleme komitemde yer alan, bitkisel materyal konusunda teminini sağlayan ve teşhislerini yapan Prof. Dr. Hulusi MALYER'e

Tez izleme komiteme katılan, yardımını, desteğini ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Elif TÜMAY ÖZER' e

Doktora çalışmalarım süresince her türlü destek, sabır ve anlayış gösteren hocam Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e ve arkadaşım Araş. Gör. Dr. Önder AYBASTIER'e, U.Ü. Kimya bölümü, çok değerli Hocalarım ve sevgili arkadaşlarıma

Deneysel çalışmalarına imkân sağlayan Bursa Organize Sanayi Bölgesi Atıksu Arıtma Tesisi Yöneticiliğine ve bu sürede bana destek olan Bursa Çevre Merkezi Laboratuvarından çalışma arkadaşlarıma

Tez çalışmalarım boyunca maddi, manevi emek ve destekleriyle hep yanımda hissettiğim, göstermiş oldukları sabır, anlayış, içtenlik ve özveriden dolayı anneme, babama, kardeşlerime, beni her zaman anlayışla karşılayan eşime ve varlığıyla tüm sıkıntılarımı unutturan canım oğlum Ömer Batu IŞIK'a

En içten teşekkürlerimi sunarım.

27/04/2017

Esra IŞIK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Fenolik Bileşikler.....	3
2.1.1. Fenolik bileşiklerin doğada bulunuşu.....	3
2.1.2. Fenolik asitler.....	4
2.1.3. Flavonoidler.....	5
2.1.3.1. Flavonoller.....	7
2.1.3.2. Flavonlar.....	7
2.1.3.3. Flavanonlar.....	8
2.1.3.4. İzoflavonlar.....	8
2.1.3.5. Flavanoller.....	9
2.1.3.6. Antosiyaninler.....	10
2.2. Fenolik Bileşiklerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	13
2.3. Türkiye’de Yetişen Bazı Yabani Meyveler.....	14
2.3.1. <i>Sorbus</i> L. türleri: <i>Sorbus domestica</i> L. (Ak üvez) ve <i>Sorbus torminalis</i> L. (Akçağaç Yapraklı Üvez).....	15
2.3.2. <i>Prunus</i> L. türleri: <i>Prunus divaricata</i> Ledeb.subsp. <i>divaricata</i> (Yunus eriği) ve <i>Prunus spinosa</i> L. (Çakal eriği).....	16
2.3.3. <i>Diospyros</i> L. türleri: <i>Diospyros lotus</i> L. (kara hurma).....	16
2.4. Analitik Yöntemler.....	17
2.4.1. Ekstraksiyon işlemleri.....	18
2.4.2. Hidroliz işlemleri.....	19
2.4.3. Kromatografik teknikler.....	21
2.5. Antioksidan Kapasite Tayin Metotları.....	22
2.5.1. ABTS metodu.....	23
2.5.2. DPPH metodu.....	23
2.5.3. FRAP metodu.....	24
2.5.4. CUPRAC metodu.....	24
2.5.5. Cr (VI) antioksidan kapasite (CHROMAC) metodu.....	25

2.5.6. TRAP metodu.....	26
2.5.7. ORAC metodu.....	26
2.6. Kimyasal Yapının Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1.Çalışmada kullanılan yabani meyveler.....	29
3.1.2.Yüksek performanslı sıvı kromatografisi diod serili dedektör.....	29
3.1.3. Ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi.....	29
3.1.4. pH metre.....	30
3.1.5. Analitik terazi.....	30
3.1.6. Saf su cihazı.....	30
3.1.7. Çoklu manyetik karıştırıcı.....	30
3.1.8. Ultrasonik banyo.....	30
3.1.9. Etüv.....	30
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	30
3.2.1.Analitik saflıktaki kimyasallar.....	30
3.2.2. Diğer kimyasallar.....	31
3.2.3. Sarf malzemeler.....	32
3.2.4. Standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.....	32
3.2.5. Asidik hidroliz için kullanılan çözelti.....	32
3.2.6. Bazik hidroliz için kullanılan çözelti.....	33
3.2.7. Enzimatik hidroliz için kullanılan çözelti.....	33
3.2.8. Toplam fenol, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	33
3.3. Yöntem.....	34
3.3.1. Yabani meyvelerin toplanması ve analize hazırlanması.....	34
3.3.2. Ekstraksiyon çalışmaları.....	35
3.3.3. Asidik hidroliz.....	36
3.3.4. Bazik hidroliz.....	36
3.3.5. Asidik bazik hidroliz.....	37
3.3.6. Enzimatik hidroliz.....	37
3.3.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışma koşulları.....	38
3.3.8. Ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi ile toplam fenol tayini.....	38
3.3.9. Ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi ile toplam flavonoid tayini..	39
3.3.10. ABTS antioksidan kapasite metodu.....	39
3.3.11. CUPRAC antioksidan kapasite metodu.....	40

3.3.12 Cr (VI) antioksidan kapasite (CHROMAC) metodunun geliştirilmesi.....	40
4. BULGULAR.....	44
4.1. CHROMAC metodunun optimizasyon sonuçları.....	44
<i>pH/E0 değerinin belirlenmesi</i>	44
<i>Mol oranı belirlenmesi</i>	47
<i>Reaksiyon süresinin belirlenmesi</i>	47
<i>Doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi</i>	48
4.2. CHROMAC metodun gerçek örneklerle uygulanabilirliği.....	50
<i>CHROMAC metodu ile antosiyaninlerin girişim etkisinin incelenmesi</i>	52
4.3. CHROMAC metodu ve reaksiyon mekanizması.....	53
4.4. CHROMAC metodunun gerçek örneklerle istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	54
4.5. HPLC-DAD Sonuçları.....	55
4.5.1. Standart fenolik bileşiklerin HPLC-DAD sonuçları.....	55
4.5.2. HPLC-DAD analizlerinde ekstraksiyon ve hidroliz metotlarının değerlendirilmesi.....	56
4.5.3. <i>Sorbus</i> L. türlerinde bulunan fenolik maddeler.....	57
4.5.4. <i>Prunus</i> L. türünde bulunan fenolik maddeler.....	61
4.5.5. <i>Diospyros lotus</i> L. türünde bulunan fenolik maddeler.....	65
4.5.6. Analitik yöntem validasyonu.....	67
4.6. Spektroskopik Yöntemler.....	68
4.6.1. Toplam fenol miktarları.....	68
4.2.2. Toplam flavonoid miktarları.....	70
4.2.3. Antioksidan kapasite miktarları.....	72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	74
5.1. Kromatografik Yöntemler.....	74
5.1.1. <i>Sorbus</i> L. türlerinde bulunan fenolik maddelerin HPLC-DAD sonuçları...	75
5.1.2. <i>Prunus</i> L. türlerinde bulunan fenolik maddelerin HPLC-DAD sonuçları...	76
5.1.3. <i>Diospyros</i> L. türünde bulunan fenolik maddelerin HPLC-DAD sonuçları..	77
5.1.4. Ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin etkisi.....	78
5.1.5. Analitik yöntem validasyonu.....	79
5.2. Spektroskopik Yöntemler.....	80
5.2.1. Toplam fenol ve toplam flavonoid tayini sonuçları.....	80
5.2.2. Antioksidan kapasite tayin sonuçları.....	81
5.2.3. İstatistiksel analiz sonuçları.....	84
KAYNAKLAR	88

EKLER.....	97
EK 1 <i>Sorbus torminalis</i> L., <i>Sorbus domestica</i> L., <i>Prunus spinosa</i> L., <i>Prunus divaricata</i> Ledeb.subsp. <i>divaricata</i> ., <i>Diospyros lotus</i> L., türü yabani meyvelerin antioksidan kapasite değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	98
EK 2 Değişen pH değerleri için Cr(VI)'nın indirgenme potansiyelinin Nernst Eşitliği dikkate alınarak hesaplanması.....	107
EK 3 Tez çalışması süresince yapılan bilimsel faaliyetler.....	108
EK 4 Farklı hidroliz teknikleri uygulanarak yabani meyve türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/kg örnek).....	109
EK 5 Toplam fenol, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan kalibrasyon grafikleri.....	110
EK 6 Patent bilgileri.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	113

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
BHT	Butilhidroksi toluen
CHROMAC	Cr (VI) antioksidan kapasite tayin yöntemi
CUPRAC	Bakır iyonu indirgeme kapasite tayin yöntemi
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FRAP	Fe(III) iyonu indirgeme gücü kapasite tayin yöntemi
GC	Gas chromatography (Gaz kromatografisi)
HPLC	High performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
HPLC-DAD	High performance liquid chromatography-diode array dedector (Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör)
ORAC	Oksijen radikalini absorblama kapasite tayin yöntemi
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity (Troloks eşdeğerinde antioksidan kapasite)
TRAP	Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre tayin yöntemi
UV/VIS	Ultraviolet-visible spectrophotometry (Mor ötesi-görünür bölge spektrofotometre)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.1.1. Fenolik bileşiklerin oluşum yolu.....	4
Şekil 2.1.2.1. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri.....	5
Şekil 2.1.3.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.1.3.2. Flavonoid sınıflarının temel glikolizlenme yerleri.....	6
Şekil 2.1.3.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.1.3.2.1. Flavonların kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.1.3.3.1. Flavanonların kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.1.3.4.1. İzoflavonların kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.1.3.5.1. Flavanollerin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.1.3.6.1. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.1.3.6.2. Antosiyanin yapısı.....	11
Şekil 2.1.3.6.3. Antosiyaninlerin pH değerine bağlı kimyasal yapıları $R_1=H$ ya da sakkarit, R_2 ve $R_3=H$ ya da metil.....	12
Şekil 2.1.3.6.4. Antosiyaninlerin bozunma reaksiyonu $R_1=H$ ya da sakkarit, R_2 ve $R_3=H$ ya da metil.....	13
Şekil 2.4.1. Bitkilerde ve gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin tayin yöntemleri	17
Şekil 2.5.5.1. Difenilkarbazid ve difenilkarbazon kimyasal yapıları.....	25
Şekil 2.6.1. Hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asitlere serbest radikal süpürme özelliği veren yapılar.....	27
Şekil 2.6.2. Flavonoidlere serbest radikal süpürme aktivitesi özelliği veren yapılar.....	27
Şekil 2.6.3. Antioksidan kapasiteyi azaltıcı yönde etki eden glikozit ve diglikozit yapılar.....	28
Şekil 3.3.2.1. Meyvelerin çözücü ekstraksiyonu.....	35
Şekil 3.3.3.1. Meyvelerin asidik hidroliz ekstraksiyonu.....	36
Şekil 3.3.4.1. Meyvelerin bazik hidroliz ekstraksiyonu.....	36
Şekil 3.3.5.1. Meyvelerin asidik bazik hidroliz ekstraksiyonu.....	37
Şekil 3.3.6.1. Meyvelerin enzimatik hidroliz ekstraksiyonu.....	37
Şekil 3.3.12.1. Cr(VI) nın farklı pH değerlerinde değişen potansiyel değerleri...	41
Şekil 3.3.12.2. Cr(VI) nın substitue fenoller oksidasyonunda mekanizma.....	42
Şekil 4.1.1. Cr(III) ile askorbik asit arasındaki elektronik absorpsiyon spektrumu.....	45
Şekil 4.1.2. Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Hg^{+2} varlığında girişim etkisinin incelenmesi.....	46
Şekil 4.1.3 pH=2,8 ortamında Cr(VI):Difenilkarbazid için mol oranının belirlenmesi.....	47

Şekil 4.1.4. Reaksiyon süresine bağlı olarak Cr(VI)-Difenilkarbazid kompleksinin absorbens değişimi.....	47
Şekil 4.2.1. Girişim etkisinin incelenmesi.....	49
Şekil 4.2.2. <i>Prunus divaricata</i> Ledeb. subsp. <i>divaricata</i> meyvesi için pH 2,8 ortamında farklı çözücülerde absorbens spektrumu.....	53
Şekil 4.3.1. CHROMAC metodu ve reaksiyon mekanizması.....	53
Şekil 4.5.1.1. Standart 20 mg/L fenolik maddelere ait HPLC kromatogramı (1; gallik asit, 2; klorojenik asit, 3; kafeik asit, 4; ellagik asit, 5; rutin, 6; isokuersitrin, 7; p-kumarik asit, 8; kamferol glikozit, 9; ferulik asit, 10; rosmarinik asit, mirisetin, 12; 2-hidroksisinamik asit, 13; kuersetin, 14; kamferol).....	56
Şekil 4.5.2.1. <i>Prunus spinosa</i> L. <i>a</i> ; asidik, <i>b</i> ; bazik, <i>c</i> ; asidik bazik, <i>d</i> , sulu çözelti ortamında enzimatik, <i>e</i> ; pH 5 tampon çözelti ortamında hidroliz ekstraktına ait HPLC kromatogramı.....	57
Şekil 4.5.3.1. <i>Sorbus</i> L. türlerinin metanol-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı <i>a</i> ; <i>Sorbus domestica</i> L., <i>b</i> ; <i>Sorbus torminalis</i> L.	58
Şekil 4.5.4.1. <i>Prunus</i> L. metanol-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı. <i>a</i> ; <i>Prunus spinosa</i> L., <i>b</i> ; <i>Prunus divaricata</i> Ledeb.subsp. <i>divaricata</i>	61
Şekil 4.5.5.1. <i>Diospyros lotus</i> L. metanol-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı.....	65
Şekil 4.6.1.1. <i>Sorbus domestica</i> L. için toplam fenol miktarları.....	68
Şekil 4.6.1.2. <i>Sorbus torminalis</i> L. için toplam fenol miktarları.....	68
Şekil 4.6.1.3. <i>Prunus spinosa</i> L. için toplam fenol miktarları.....	69
Şekil 4.6.1.4. <i>Prunus divaricata</i> Ledeb.subsp. <i>divaricata</i> için toplam fenol miktarları.....	69
Şekil 4.6.1.5. <i>Diospyros lotus</i> L. için toplam fenol miktarları.....	69
Şekil 4.6.2.1. <i>Sorbus domestica</i> L. için toplam flavonoid miktarları.....	70
Şekil 4.6.2.2. <i>Sorbus torminalis</i> L. için toplam flavonoid miktarları.....	70
Şekil 4.6.2.3. <i>Prunus spinosa</i> L. için toplam flavonoid miktarları.....	71
Şekil 4.6.2.4. <i>Prunus divaricata</i> Ledeb.subsp. <i>divaricata</i> için toplam flavonoid miktarları.....	71
Şekil 4.6.2.5. <i>Diospyros lotus</i> L. için toplam flavonoid miktarları.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1.1. Bitkilerdeki fenolik bileşik sınıfları.....	3
Çizelge 2.1.2.1. Hidroksibenzoik asitlerin genel sınıflandırılması.....	5
Çizelge 2.1.2.2. Hidroksisinamik asitlerin genel sınıflandırılması.....	5
Çizelge 2.1.3.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı.....	7
Çizelge 2.1.3.2.1. Flavonların kimyasal yapısı.....	8
Çizelge 2.1.3.3.1. Flavanonların kimyasal yapısı.....	8
Çizelge 2.1.3.4.1. İzoflavonların kimyasal yapısı.....	9
Çizelge 2.1.3.5.1. Flavonollerin kimyasal yapısı.....	10
Çizelge 2.1.3.6.1. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı.....	11
Çizelge 3.1.3.1. Varian marka Cary-50 Conc cihazının çalışma şartları.....	29
Çizelge 3.3.7.1. HPLC-DAD için çalışma koşulları.....	38
Çizelge 4.1.1 Fenolik maddeler için doğrusal çalışma aralığı, R ² ve TEAC değerleri.....	49
Çizelge 4.1.2. Fenolik maddeler için TEAC değerlerinin karşılaştırılması.....	50
Çizelge 4.2.1. Glisin, sitrik asit ve glikoz içeriğinde CHROMAC yöntemiyle tayin edilen antioksidan kapasite değerleri.....	51
Çizelge 4.5.1.1. Standart fenolik maddeler için HPLC-DAD kalibrasyon grafikleri.....	55
Çizelge 4.5.3.1. Ekstraksiyon metodu kullanılarak <i>Sorbus domestica</i> L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları.....	59
Çizelge 4.5.3.2. Ekstraksiyon metodu kullanılarak <i>Sorbus torminalis</i> L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları.....	60
Çizelge 4.5.4.1. Ekstraksiyon metodu kullanılarak <i>Prunus spinosa</i> L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları.....	61
Çizelge 4.5.4.1. Ekstraksiyon metodu kullanılarak <i>Prunus spinosa</i> L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (Devamı).....	62
Çizelge 4.5.4.2. Ekstraksiyon metodu kullanılarak <i>Prunus divaricata</i> Ledeb. subsp. <i>divaricata</i> türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları.....	64
Çizelge 4.5.5.1. Ekstraksiyon metodu kullanılarak <i>Diosporus lotus</i> L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları.....	66
Çizelge 4.5.6.1. Analitik yöntem validasyonu ve geri kazanım değerleri.....	67
Çizelge 4.6.3.1. <i>Sorbus domestica</i> L. için antioksidan kapasite değerleri.....	72
Çizelge 4.6.3.2. <i>Sorbus torminalis</i> L. için antioksidan kapasite değerleri.....	72
Çizelge 4.6.3.3. <i>Prunus spinosa</i> L. için antioksidan kapasite değerleri.....	73
Çizelge 4.6.3.4. <i>Prunus divaricata</i> Ledeb. subsp. <i>divaricata</i> için antioksidan kapasite değerleri.....	73

Çizelge 4.6.3.5. <i>Diospyros lotus</i> L. için antioksidan kapasite değerleri.....	73
Çizelge 5.2.3.1a. <i>Diospyros lotus</i> L. için ultrasonik ekstraktlarında antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasındaki ilişki.....	84
Çizelge 5.2.3.1b. <i>Diospyros lotus</i> L. için çözücü ekstraktlarında antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasındaki ilişki.....	84
Çizelge 5.2.3.2a. <i>Diospyros lotus</i> L. için ultrasonik ekstraktlarında ABTS ve CHROMAC antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasına uygulanan t testi sonuçları (%95).....	84
Çizelge 5.2.3.2b. <i>Diospyros lotus</i> L. için çözücü ekstraktlarında ABTS ve CHROMAC antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasına uygulanan t testi sonuçları (%95).....	85
Çizelge 5.2.3.2c. <i>Diospyros lotus</i> L. için ultrasonik ekstraktlarında CUPRAC ve CHROMAC antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasına uygulanan t testi sonuçları (%95).....	85
Çizelge 5.2.3.2d. <i>Diospyros lotus</i> L. için ultrasonik ekstraktlarında CUPRAC ve CHROMAC antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasına uygulanan t testi sonuçları (%95).....	86

1. GİRİŞ

Doğal ürünlerin besin değerini arttıran maddeler; yaşlanma ve yaşlanma sonucu oluşan hastalıkların sebebi olan serbest radikalleri önleyen savunma mekanizmalarıdır. Vücutta oluşan serbest radikallerin aktivasyonu antioksidan adı verilen savunma mekanizmalarıyla engellenmektedir. Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksidasyonun insan sağlığı için oluşturduğu tehlikeleri hücresel boyutta engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır. Antioksidan etkiden sorumlu olan grubun da fenolik maddeler olduğu bilinmektedir (Tsao ve Yang 2003, Huang ve ark. 2005).

Bitkisel kaynaklı besinler içerisinde meyveler, fenolik maddeler bakımından zengin doğal antioksidan kaynaklarıdır. Özellikle yabani meyvelerin yapısında bulunan zengin fenolik madde içeriğinin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin ortaya konulmasından sonra ve yapay olarak elde edilen maddelerden uzaklaşmaya başlanması ile doğal fenolik maddelere olan ilgi ve önemini daha da artacağını düşündürmektedir. Gıda ve farmakoloji alanlarındaki kullanım olanakları yanında, insan sağlığı üzerinde de önemli destekleri bulunan fenolik maddelerin, etki mekanizmalarının anlaşılması ve teknolojik olarak kullanılabilme yollarının araştırılmasının önemli olduğu görülmektedir. Bu nedenle, yapılan bilimsel çalışmalarda da doğal ürünlerin antioksidan özelliğinin belirlenmesi ve antioksidan kapasite tayin metotlarının geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

Sorbus torminalis L. (Pitlicen. Akçaağaç Yapraklı Üvez), *Sorbus domestica* L. (Ak Üvez), *Sorbus torminalis* L. (Pitlicen. Akçaağaç Yapraklı Üvez), *Sorbus domestica* L. (Ak Üvez), (Güner, A. 2012 de ***Cormus domestica*** (L.) Spach. nın sinonimi olarak alınmıştır.) *Prunus spinosa* L. (Çakal eriği), *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* (Yunus eriği), *Diospyros lotus* L. (Kara hurma, Hırnık), türü yabani meyveleri, ülkemizde doğal yayılış göstermektedir (Davis 1972, Güner 2012). Yabani meyveler üzerinde yapılan çalışmalarda; bu meyvelerin antienflamatuvar, antidiabetik, antiviral ve antioksidan kapasite gibi özelliklere sahip oldukları belirtilmektedir (Lust 1980, Baytop 1999, Demirezer 2007, Olszewska ve Roj 2011).

Antioksidan kapasite tayin metotları, ölçüm prensipleri, deneysel koşullar ve reaksiyon verebildikleri fenolik madde gruplarına göre değişim göstermektedirler. Dolayısıyla antioksidan kapasitesi tayin edilmek istenen materyalin tek bir metotla değil farklı metotlarla kapasite değerinin belirlenmesi tahmin edilen değer için daha doğru sonuç verebilir. Bu amaçla literatürde bulunan mevcut antioksidan kapasite tayin metotlarına alternatif olabilecek yeni bir antioksidan kapasite tayin metodu olan Cr(VI) antioksidan kapasite (CHROMAC) metodu literatüre kazandırmak adına metot geliştirme çalışmaları yapılmıştır. CHROMAC metodu; Cr(VI)'nın asidik ortamda organik maddeleri yükseltgeme ve 1,5-difenilkarbazid ile kararlı diaquabis(1,5-difenilkarbazon) krom(III) kompleksi oluşturma özelliğine dayanmaktadır. CHROMAC metodunun geliştirilmesinde uygun pH/E⁰ değeri, Cr(VI)'nın 1,5-difenilkarbazid ile girdiği reaksiyondaki mol oranı, reaksiyon süresi ve fenolik maddeler için doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda CHROMAC metodu alternatif bir antioksidan kapasite metodu olarak literatüre kazandırılmıştır (Işık ve ark. 2013). Ayrıca Bursa'da doğal yetişen *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., türlerinin meyvelerindeki fenolik maddelerin kantitatif tayinlerine uygun örnek hazırlama ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanılarak tayin yöntemi geliştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler; kimyasal olarak kısaca, sahip olduğu aromatik halkada çeşitli fonksiyonel gruplara (esterler, metilesterler, glikozidler vb.) ilaveten hidroksil grubu taşıyan madde olarak tanımlanır. Fenol'ün kendisi de doğal bir üründür ancak çoğu fenolik bileşik iki veya daha fazla sayıda hidroksil grubu taşımaktadır. Fenolik bileşikler karbon yapısına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılırlar (Çizelge 2.1.1).

Çizelge 2.1.1. Bitkilerdeki fenolik bileşik sınıfları (Dey ve Harborne 1989)

Karbon atom sayısı	Temel iskelet	Sınıf	Örnek
6	C ₆	Basit Fenoller Benzokinonlar	Katesol, hidrokinon, 2,6-dimetoksi benzokinon
7	C ₆ -C ₁	Fenolik asitler	p-hidroksi benzoik asit, Salisilik asit
8	C ₆ -C ₂	Asetofenonlar Fenilasetik asitler	3-Asetil-6-metoksi benzaldehit, p-hidroksifenilasetik asit
9	C ₆ -C ₃	Hidroksisinamik asitler, Fenil propenler Kumarinler Izokumarinler Kromonlar	Kafeik asid, ferulik asid, miristisin, eugenol, umbelliferon, aesculetin, bergenin, eugenin.
10	C ₆ -C ₄	Naftakinonlar	Juglon, plumbagin
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantonlar	Mangiferin
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenler, Antrakinonlar	Lunularik asit, Emodin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidler İzoflavonoidler	Kuersetin, siyanidin, Genistein
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanlar, Neolignanlar	Pinoresinol, Eusiderin
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidler	Amentoflavon

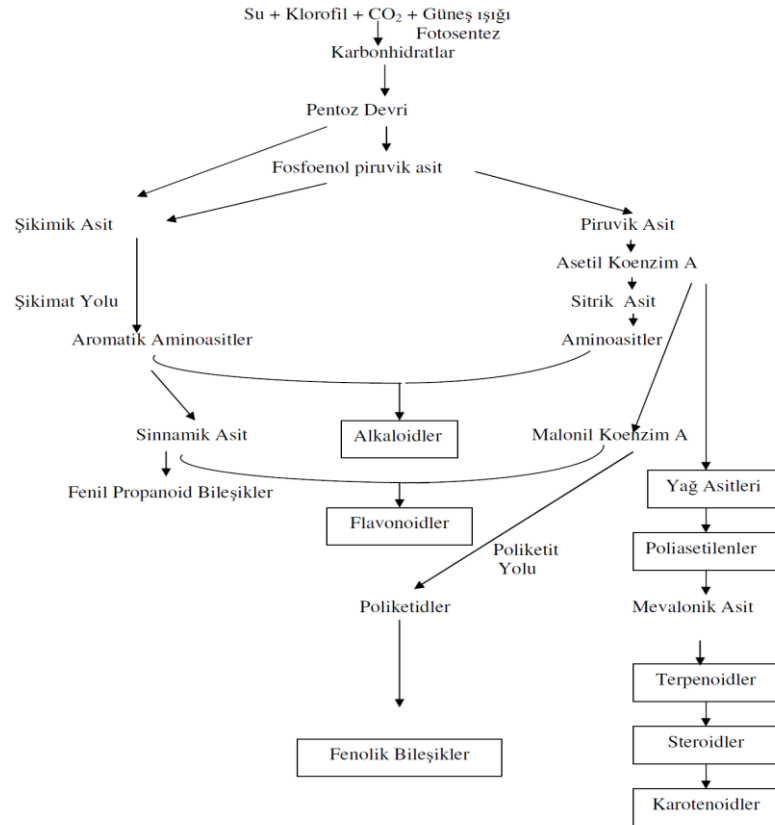
2.1.1. Fenolik bileşiklerin doğada bulunuşu

Fenolik bileşikler; fenol gibi oldukça basit bileşiklerden proantosiyanidinler gibi yüksek derecede polimerleşmiş yapılara kadar çok geniş bir aralığı kapsamaktadırlar. Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin biyosentetik olarak iki ana yoldan oluşumu Şekil 2.1.1.1'de kısaca özetlenmektedir (Dey ve Harborne, 1989).

1- Doğrudan hidroksi sinnamik asit ve kumarinler gibi fenil propanoidleri veren şikimik asit yolu.

2-Pek çok kinonları ve basit fenolleri üretebilen poliketit yolu.

Fenolik bileşiklerin en geniş sınıfı olan flavonoidler, biyosentetik olarak belirtilen iki yolun birleşiminden oluşmaktadır (Demirkıran 2005).

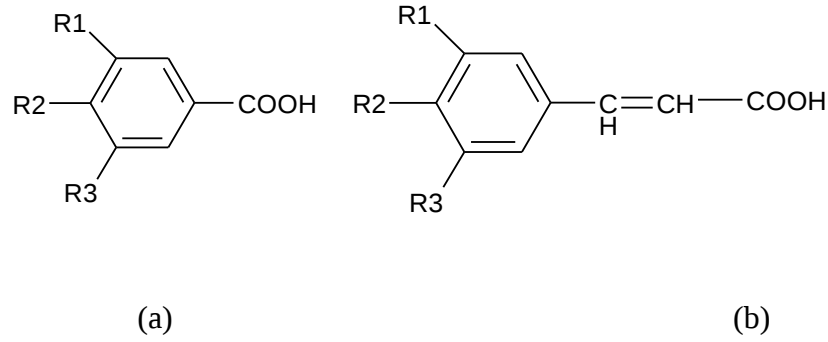


Şekil 2.1.1.1. Fenolik bileşiklerin oluşum yolu (Dey ve Harborne 1989)

2.1.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler, hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki temel gruba ayrılır. Hidroksibenzoik asitler, C₆-C₁ yapısında bir fonksiyonel karboksilik aside sahip fenolik bileşiklerdir ve en yaygın olarak gallik, *para*-hidroksibenzoik, vanilik, siringik ve protokatekuik asit bilinmektedir. Hidroksisinamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına bağlı olarak farklı özellik göstermektedirler. En yaygın bulunanları; *para*-kumarik, ferulik, kafeik ve sinapik asitlerdir. Bitkilerde bulunan fenolik asitlerin büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş haldedir (Balasundram ve ark. 2006,

Nizamlioğlu ve Nas 2010). Fenolik asitlerin genel yapısı Şekil 2.1.2.1' de ve hidroksibenzoik asitlerin ve hidroksisinamik asitlerin genel sınıflandırılmaları Çizelge 2.1.2.1 ve Çizelge 2.1.2.2 'de verilmektedir.



Şekil 2.1.2.1. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri (Shahidi ve Naczki 1995)

Çizelge 2.1.2.1. Hidroksibenzoik asitlerin genel sınıflandırılması

Hidroksibenzoik asitler	R1	R2	R3
p-hidroksibenzoik asit	H	OH	H
Protokatekuik asit	H	OH	OH
Vanilik asit	OCH ₃	OH	H
Siringik asit	OCH ₃	OH	OCH ₃
Gallik asit	OH	OH	OH

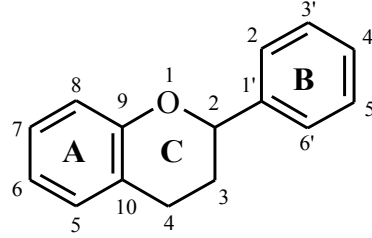
Çizelge 2.1.2.2. Hidroksisinamik asitlerin genel sınıflandırılması

Hidroksisinamik asitler	R1	R2	R3
p-kumarik asit	H	OH	H
Kafeik asit	H	OH	OH
Ferulik asit	OCH ₃	OH	H
Sinapik asit	OCH ₃	OH	OCH ₃

2.1.3. Flavonoidler

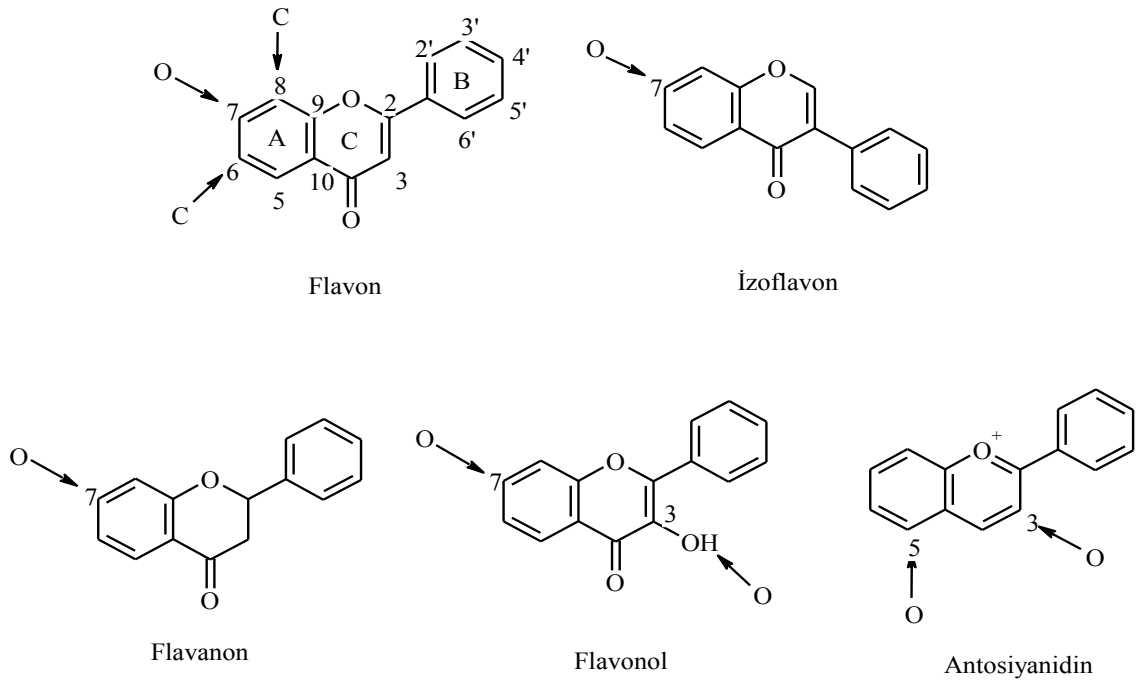
Flavonoidler, iki benzen halkası (A ve B) ve bu halkaları birbirine bağlayan, oksijen içeren piran veya piron halkasından oluşan benzer şekilde sıralanmış C₁₅ (C₆-C₃-C₆) yapısına sahip bileşiklerdir (Şekil 2.1.3.1). Flavonoidler bitkilerde en fazla glikozit türevleri olarak bulunmalarına rağmen aglikonlar olarak da bulunurlar. Hidroksil gruplarının her biri çeşitli fenolik ve alifatik asitlerle açillenebilir ve bazı karbonlar bir ya da daha fazla farklı basit karbonhidratla yer değiştirebilir. Bitkilerde, flavonoidler hidroksilleme, metilleme ve en önemlisi glikolizleme gibi çeşitli yapılar da bulunabilirler (Robards ve Antolovich 1997). Ayrıca flavonoid yapısındaki sübstientler

benzil, sinamil, hidroksil, izofenil ve metoksil içerebilirler (Harborn ve Williams 2000). Flavonoidler ('C') halkasındaki değişiklik nedeniyle flavonlar, flavononlar, izoflavonlar, flavonoller, antosiyaninler ve flavanoller olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar. Flavonoidlerin kimyasal yapısı Şekil 2.1.3.1' de verilmektedir.



Şekil 2.1.3.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Flavonoid yapılarında herhangi bir hidroksil grubu glikolizlenebilir. Glikolizasyon etkisi flavonoidleri serbest radikallere karşı daha az reaktif ve daha fazla suda çözülebilir hale getirir. Glikolizleme, çoğunlukla hücre boşlukları içinde bulunan flavonoidlerin depolanmasına da olanak verir (Robards ve Antolovich 1997). Şekil 2.1.3.2'de flavonoid sınıflarının temel glikolizlenme yerleri verilmektedir.

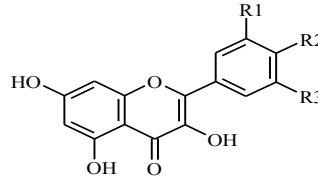


Şekil 2.1.3.2. Flavonoid sınıflarının temel glikolizlenme yerleri

2.1.3.1. Flavonoller

Flavonoller meyvelerde en fazla bulunan flavonoidlerdir ve genel yapıları Şekil 2.1.3.1.1 ve Çizelge 2.1.3.1.1’ de verilmektedir. Bu bileşikler, genellikle O-glikozitler olarak en yaygın ‘C’ halkasının 3 pozisyonunda hidroksil grubuyla konjuge olmuş yapıda bulunurlar (Kris-Etherton ve ark. 2002, Nichenametla ve ark. 2006). Bu yapının şeker kısmını çoğunlukla glikoz ya da ramnoz oluştururken galaktoz, arabinoz, ksiloz, glukuronik asit gibi şeker yapıları da bulunabilmektedir. Meyvelerde en yaygın bulunan flavonoller kuersetin, kamferol, mirisetin ve izoramnetindir.

Flavonoller biosentezleri sırasında ışııkla uyarılmaları nedeniyle eser miktarda, bitkinin toprak yüzeyine yakın kısmında bulunurken genel olarak meyvelerin dışında, kabuk ve yaprakları gibi hava ile temas eden bölgelerinde birikirler (Manach ve ark. 2004).



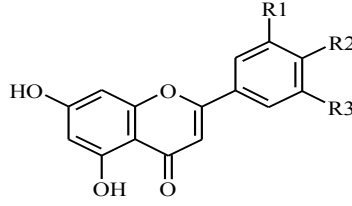
Şekil 2.1.3.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.3.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı

Flavonol	R1	R2	R3
Kuersetin	OH	OH	H
Kamferol	H	OH	H
Mirisetin	OH	OH	OH

2.1.3.2. Flavonlar

Flavonlar meyvelerde ve sebzelerde yaygın olarak bulunmazlar. Flavonlar, temel olarak luteolin ve apigenin glikozitlerinden oluşmaktadır. Flavonların kimyasal yapısı Şekil 2.1.3.2.1 ve Çizelge 2.1.3.2.1’ de verilmektedir. Maydanoz ve kerevizin önemli flavon kaynağı olduğu belirlenmiştir (Manach ve ark. 2004). Turunçgil meyvelerinin kabukları oldukça fazla miktarda polimetoksilat flavonları: tangeretin, nobiletin ve sinensetin içerirler. Nobiletin ve sinentin taze, şekerli, portakal kabuğunda ve tangeretininde ise mandalina yağında bulunduğu bilinmektedir (Shahidi ve Nacz 1995, Robards ve Antolovich 1997). Ayrıca bu polimetoksilat flavonlar en hidrofobik flavonoidlerdir (Manach ve ark. 2004).



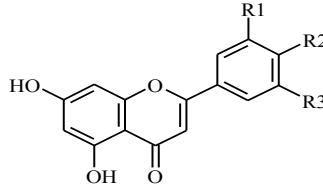
Şekil 2.1.3.2.1. Flavonların kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.3.2.1. Flavonların kimyasal yapısı

Flavon	R1	R2	R3
Luteolin	OH	OH	H
Apigenin	H	OH	H

2.1.3.3. Flavanonlar

Flavanonlar, bitkilerde diğer flavonoidler ile karşılaştırıldığında daha az miktarda bulunurlar. Flavanonlar hidroksilli glikozitler ve o-metilli türevleri olarak bulunurlar (Scalbert ve ark. 2005, Crozier ve ark. 2006, Espin ve ark. 2007) ve turunçgil meyvelerinin temel flavonoidleridir. Temel aglikonları naringenin, eriodiktyol ve hesperetin Şekil 2.1.3.3.1 ve Çizelge 2.1.3.3.1’ de gösterilmektedir. Diğer bitkilerin flavanonları nadiren glikozidik şekilde bulunurken turunçgil flavanonları genellikle glikozitleri olarak bulunur (Robards ve Antolovich 1997).



Şekil 2.1.3.3.1. Flavanonların kimyasal yapısı

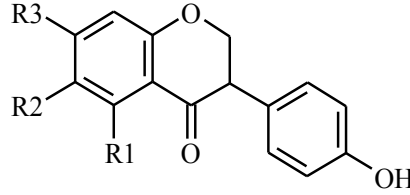
Çizelge 2.1.3.3.1. Flavanonların kimyasal yapısı

Flavanon	R1	R2	R3
Naringenin	H	OH	H
Eriodiktyol	OH	OH	H
Hesperetin	OH	OCH ₃	H

2.1.3.4. İzoflavonlar

İzoflavonlar; östrojene yapısal benzerlik gösteren flavonoid grubunda yer almaktadır. Steroid olmamalarına rağmen estradiol molekülü içinde 7 ve 4' konumlarında hidroksil gruplarına sahiptirler. İzoflavonlar gerçek olmayan hormonal özellik taşırlar ve östrojen alıcıları bağlama yeteneğindedirler. Bu özellik sebebiyle bitkisel kaynaklı östrojenik

etkiye sahip yapılar olarak sınıflandırılırlar. Temel izoflavonlar genistein, daidzein ve glisiteindir (Şekil 2.1.3.4.1) (Manach ve ark. 2004).



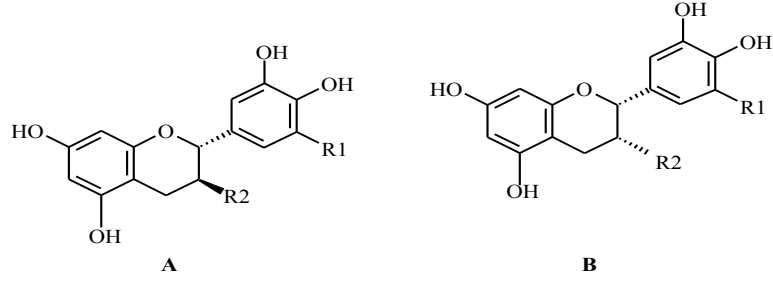
Şekil 2.1.3.4.1. İzoflavonların kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.3.4.1. İzoflavonların kimyasal yapısı

İzoflavonlar	R1	R2	R3
4',7-Dihidroksiizoflavon (Daidzein)	H	H	OH
4',5,7-Trihidroksiflavon (Genistein)	OH	H	OH
4',7-Dihidroksi-6-metoksiisoflavon (Glisitein)	H	OCH ₃	OH

2.1.3.5. Flavanoller

Flavanoller en karmaşık flavonoidlerdir ve heterosiklik C halkasının C₂ ve C₃ iki kiral merkezleriyle karakterize edilmektedirler (Crozier ve ark. 2006, Iriti ve Faoro 2006, Nichenametla ve ark. 2006). Flavanoller hem monomerik (kateşinler) hem de polimerik (proantosiyanidinler) yapıda bulunurlar ve meyvelerin önemli bileşenleridir. Şekil 2.1.3.5.1' de flavanollerin kimyasal yapısı gösterilmektedir. Kateşinler prosiyanidinler için monomer birimleridir. Monomerler arasından (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (+)-gallokateşin ve (-)-epigallokateşin bileşiklerinin meyvelerde bulunduğu bildirilmektedir (Robards ve Antolovich 1997). Flavonoidlerin diğer sınıflarının tersine flavanoller meyvelerde glikozit yapılarından çok serbest halde bulunurlar (Manach ve ark. 2004). Yeşil çay ve çikolata en zengin kateşin kaynağı olarak bilinmektedir. Gallokateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin gallatlar bazı baklagiller, üzüm ve daha önemlisi çayda bulunabilirken kateşinler ve epikateşinler meyvelerin temel flavanoller arasında yer almaktadır (Arts ve ark. 2000 a,b). Kateşinlerin önemi hem doğal polifenoloksidaz substratları olmaları hem de kahverengileşme olayında bulunmalarından kaynaklanmaktadır (Manach ve ark. 2004).



Şekil 2.1.3.5.1. Flavanollerin kimyasal yapısı

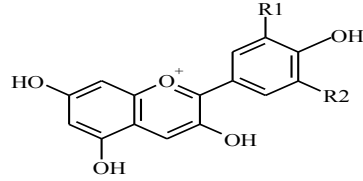
Çizelge 2.1.3.5.1. Flavonollerin kimyasal yapısı

Flavonol (A/B)	R1	R2
(+)kateşin/(-)epikateşin	H	OH
(+)kateşin galat /(-)epikateşin gallat	H	O-gallat
(+)gallokateşin/(-)epigallokateşin	OH	OH
(+)gallokateşin gallat/(-)epigallokateşin gallat	OH	O-gallat

2.1.3.6. Antosiyaninler

Antosiyaninler suda çözülebilir pigmentlerdir ve çoğu bitki türlerinin pembe, kırmızı, mavi ya da mor renginden sorumlu olan flavonoidlerdir (Castañeda-Ovando ve ark. 2009). Antosiyanin moleküllerinin sağladığı renkler ilk kez 1939 yılında Pauling tarafından açıklanmıştır. Pauling antosiyaninlerin renk şiddetine rezonans yapıdaki flavilyum iyonunun sebep olduğunu ileri sürmüştür (Wrolstad ve ark. 2005). Antosiyaninlerin temel yapıları antosiyanidinlerdir. Antosiyanidinler (ya da aglikonlar); bir aromatik halka (A) nın oksijen içeren heterosiklik halkaya (C) bağlanması ve yapının da karbon-karbon bağlarıyla üçüncü aromatik halkaya (B) bağlandığı yapılardır (Konczak ve Zhang 2004). Şekil 2.1.3.6.1 ve Çizelge 2.1.3.6.1’ de antosiyanidinlerin kimyasal yapısı verilmektedir. Antosiyanidinler oldukça kararsız yapılardır. Antosiyanidinler glikozit yapılarında bulunduklarında (bir şekere bağlandıklarında) antosiyaninler olarak bilinirler (Şekil 2.1.3.6.2) (Castañeda-Ovando ve ark. 2009). Glikolizasyon antosiyaninlere kararlılık sağlar. Bağlanma C-3 ve daha sık olarak da C-5 pozisyonlarında meydana gelebilir (Mazza ve Miniati 1993, Springob ve ark. 2003). En yaygın olan glikozil gruplar monosakkaritlerdir özellikle de glukoz, galaktoz, ramnoz ve arabinozdur. Açılma için ise en yaygın olan açıl grupları antosiyaninlere bağlı bulunan hidroksisünamik asitler (özellikle kafeik, ferulik ve *para*-kumarik asitler), alifatik dihidrokarboksilat ve malonik asittir (Williams ve Grayer 2004). Açılma suda

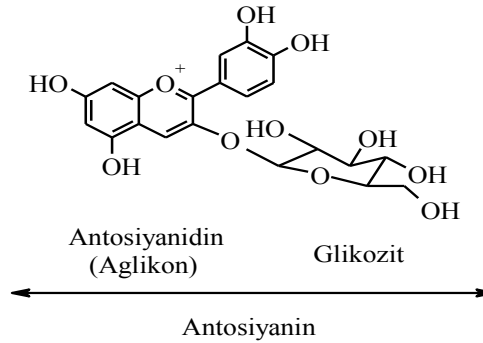
çözülebilirliği arttırır ve enzim katalizli glikozidaz bozunmalarına karşı koruma sağlayabilir (Springob ve ark. 2003).



Şekil 2.1.3.6.1. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.3.6.1. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı

Antosiyanidin	R1	R2
Siyanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OH	OCH ₃

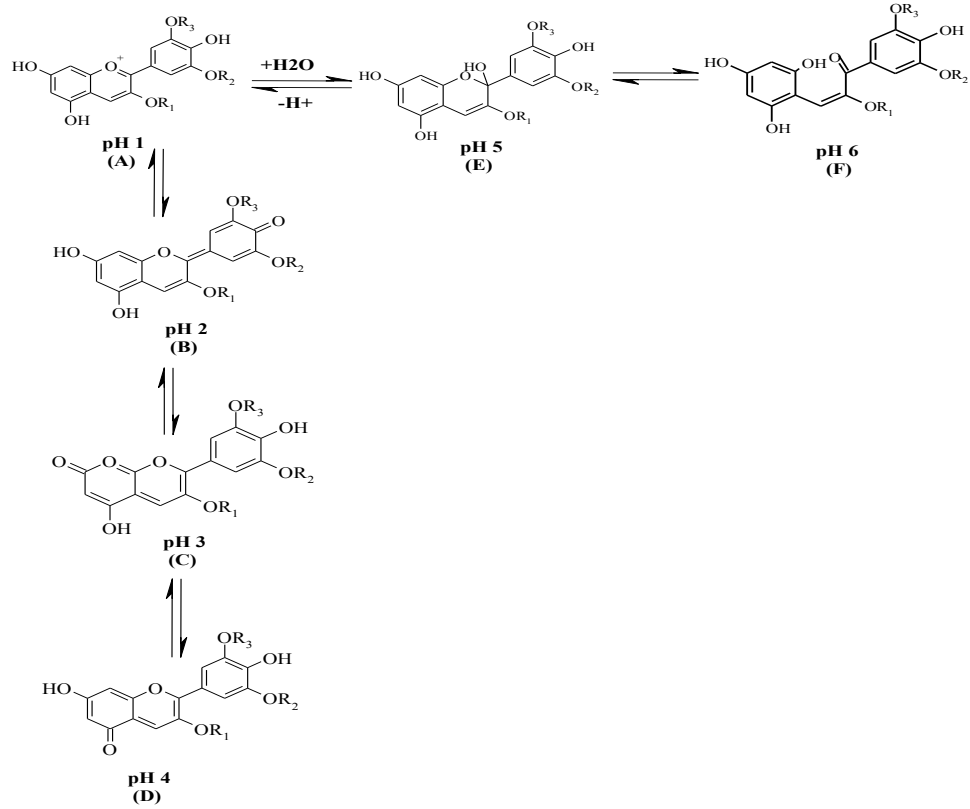


Şekil 2.1.3.6.2. Antosiyanin yapısı

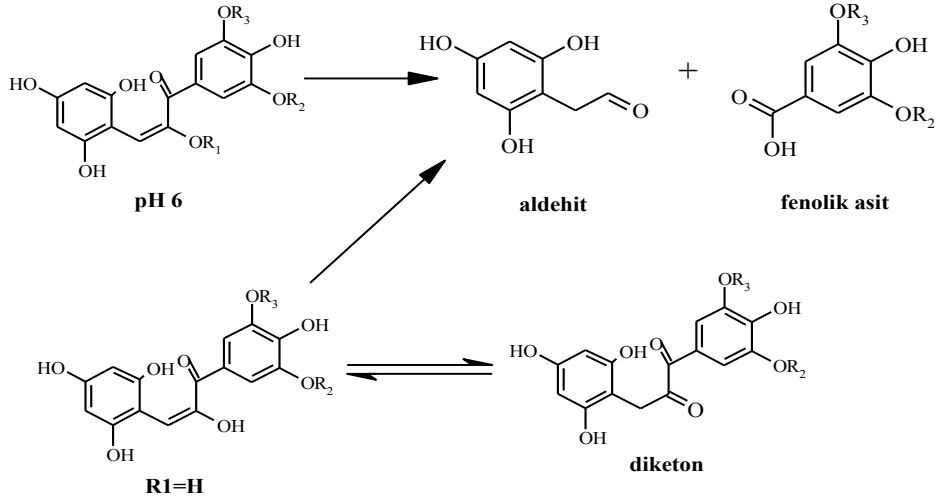
Antosiyaninlerin kararlılığı; pH, saklama sıcaklığı, kimyasal yapı, miktar, ışık, oksijen, çözücüler ve enzimler, flavonoidler, proteinler ve metalik iyonlar gibi faktörlerden etkilenmektedir (Rein 2005).

Antosiyaninler ortam pH değerine bağlı olarak farklı kimyasal yapıda bulunabilmektedirler (da Costa ve ark. 1998, Fleschhut ve ark. 2006). pH' nın 1 olduğu ortamda flavilyum katyonu (kırmızı renkli) baskın türdür, kırmızı ve mor renklere katkıda bulunur. pH değeri 2 ile 4 arasında olduğunda kuinoidal mavi türler baskındır. pH 5 ile 6 arasında olduğunda renksiz iki tür sırasıyla karbinol pseudobaz ve kalkon mevcudiyedi söz konusudur. pH değeri 7'den büyük olduğunda antosiyaninler yapılarındaki süstitüent gruplarına bağlı olarak bozunmaktadırlar (Şekil: 2.1.3.6.3). pH

değeri 4 ile 6 arasında olduğunda ise antosiyaninin dört yapısı; flavilyum katyonu, susuz kuinodial baz, renksiz karbinol baz ve açık sarı renkli kalkon aynı anda bulunmaktadır. Kuinodial bazlar ve karbinol arasındaki denge flavilyum katyonu aracılığıyla oluşur (Şekil 2.1.1.6.3 D, A ve E yapıları). pH arttırıldığında, susuz bazın miktarı arttığında ve daha asidik koşullarda baskın türler kırmızı flavilyum iyonudur (Cooper-Driver 2001). Nötr ortamda aglikon kararlılığı azalmaktadır. Aglikonların tersine, monoglikozitler ve çoğunlukla diglikozitlerin türevleri nötr pH ortamında daha kararlıdır. Bu davranış, şeker moleküllerinin kararsız ara ürünleri olan fenolik asit ve aldehit bileşiklerine bozunmasıyla açıklanmaktadır (Fleschhut ve ark. 2006) (Şekil 2.1.3.6.4)



Şekil 2.1.3.6.3. Antosiyaninlerin pH değerine bağlı kimyasal yapıları $R_1=H$ ya da sakkarit, R_2 ve $R_3=H$ ya da metil (Castañeda-Ovando ve ark. 2009).



Şekil 2.1.3.6.4. Antosiyaninlerin bozunma reaksiyonu $R_1=H$ ya da sakkarit, R_2 ve $R_3=H$ ya da metil (Castañeda-Ovando ve ark. 2009).

Doğada çok fazla sayıda ve çeşitte antosiyanin vardır. Antosiyaninler arasındaki temel farklar; hidroksillenmiş grupların sayısı, yapıya bağlı olan şekerlerin sayısı, moleküldeki şeker bağlanan aromatik ve alifatik karboksilatlar ve bu bağların pozisyonu olarak sıralanabilmektedir (Kong ve ark. 2003). Bitkilerde, en yaygın bilinen antosiyanidinler ise pelargonidin, peonidin, siyanidin, malvidin, petunidin ve delphinidindir (Clifford ve Scalbert 2000).

2.2. Fenolik Bileşiklerin Sağlık Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin lipid, protein ve nükleik asitlere oksidatif hasar yaparak, hücre içindeki yapıları bozarak ve DNA yapısındaki biyokimyasal bileşiklerde bozulmalara yol açarak birçok farklı hastalığa yol açabileceği belirtilmektedir (Tunalıer ve ark. 2002, Saldamlı 2007, Demiray ve Tülek 2008). Serbest radikaller, kanser, kalp hastalıkları, akciğer hastalıkları, katarakt gibi pek çok hastalığa neden olmaktadır. Antioksidan maddeler, serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonu durdurarak, oksijeni ve metalleri bağlayarak, oksidasyonun sebep olduğu zararları engellemektedir (Aras 2006, Karakaya ve Nehir El, 2006).

Bitkilerdeki fenolik bileşiklere olan ilgi giderek artmaktadır. Bunların doğada bulunuşları, dağılımları, biyosentezi, bitkilerdeki metabolizma ve fonksiyonlarına ait akademik çalışmaların ötesinde, fenolik bileşikler, uygulamalı bilimlerde artan bir öneme sahip olmaktadır. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar, serbest radikal gidericisi,

peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak işlevlere sahiptir. Antioksidanlar; serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkileri, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) ve lipoprotein oksidasyonunu önleyerek sağlık üzerinde olumlu etkiler yapmaktadırlar (Kafkas ve ark. 2006, Aras 2006). Fenolik bileşikler antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antirombotik etkiye sahip olduğu yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir (MacDougall 2002, Kafkas ve ark. 2006). Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve Alzheimer gibi hastalıkları engellemektedirler (MacDougall 2002, Pehlivan ve Güleriyüz 2004, Demirezer 2007, Nizamlioğlu ve Nas 2010).

Bitkisel ürünlerin antioksidan etkileri özellikle flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Flavonoidler en yüksek yapılı bitkilerden basit yapılı mantarlara kadar hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Bakteri ve yosunların büyük bir kısmında bulunmazlar. Böylece flavonoidler doğal olarak bulunan fenollerin en büyük gruplarından birini oluştururlar. Ayrıca sahip oldukları biyolojik etkinliklerinden dolayı flavonoidler bitkilerin sekonder metabolitleri arasında en önemli bileşik sınıflarından birisini oluştururlar. Flavonoidler antikarsinojenik, antialerjik ve antiinflamatuvar özellikleri yönünden bilim insanlarının dikkatini çekmektedir (Cody ve ark. 1986).

2.3. Türkiye’ de Yetişen Bazı Yabani Meyveler

Türkiye'nin bitki çeşitliliği açısından dünyanın nadir bölgelerinden olduğu ve halen binlerce bitki türüne ev sahipliği yaptığı ve bitkilerin yaklaşık üçte birinin endemik olarak sadece ülkemizde yetiştiği bilinmektedir (Güner 2012, Ekim 2009, Özhatay ve ark. 2005). Ayrıca birçok yabani meyvelerin gen kaynakları da Türkiye’dir (Ketenoglu ve ark. 2011). Bursa ve çevresi de, Türkiye’nin önemli bitki çeşitliliği merkezlerinden biri olması yanında gerek kültür gerekse yabani meyvelerin çeşitliliği bakımından da büyük bir zenginliğe sahiptir (Kaynak ve ark. 2005).

Beslenmede meyve ve sebzeler esas olarak vitamin, mineral madde ve gıda posası kaynağı olarak önem taşırlar. Özellikle yabani meyvelerin yapısında bulunan fenolik maddelerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin ortaya konulmasından sonra bu

meyveler giderek daha fazla ilgi çekmektedir ve bu ilginin de giderek artacağı düşünülmektedir. (Baytop 1999, Ebrahimzadeh ve ark. 2008)

Yenebilir yabani bitkiler, kuru arazilerde yetiştiği için, tadı, kokuları ve taşıdığı mineraller açısından tarım yoluyla yetiştirilen meyvelere göre daha yoğundur. Yabani meyveler erozyon alanlarında ve özellikle de normal meyve ağaçları için fazla rüzgârlı olan alanlarda bolca bulunur. Bu bitkiler kuşları ve böcekleri de içeren ekosistem için ev sahipliği yapar. Yerel meyveler taze veya kurutulmuş olarak (reçellerde, şerbetlerde, marmelatlarda) kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu meyvelerden birçok farklı hastalığın tedavisinde doğal ilaç olarak da yararlanılmaktadır (Ebrahimzadeh ve ark. 2008).

2.3.1. *Sorbus L.* (Üvez) türleri:

***Sorbus domestica L.* (Ak Üvez) ve *Sorbus torminalis L.* (Akçaağaç Yapraklı Üvez)**

Üvez; anavatanı Finlandiya olup Rosaceae familyasında, *Sorbus L.* cinsine ait etli meyveli çoğunlukla yabani yetişen ağaçlardır. Ülkemizde Marmara ve Karadeniz bölgelerinde doğal olarak yetişmekte ve yetiştirilmektedir. Ağustos ve Eylül aylarında hasat edilen üvezlerin (*Sorbus L.*), ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren 16 türü bulunmaktadır (Güner 2012). Bunlardan, *Sorbus domestica (L.) Crantz.* (üvez), *Sorbus torminalis (L.) Crantz.* (akçaağaç yapraklı üvez), *Sorbus aucuparia (L.)* (kuş üvezi) ve *Sorbus umbellata (Desf) Fritsch.* (ak üvez) en önemli türlerdir (Ketenoglu ve ark. 2011).

Üvez meyvesi, ham olarak yapısındaki yüksek düzeydeki fenolik bileşikler ve özellikle taneneler nedeniyle tüketilemeyecek kadar buruk bir tada sahiptir. Bu meyvelerde olgunlaşma ile fenolik madde yapısında bazı değişiklikler olmakta meyve zaman içinde yenilebilir bir hale gelmektedir. Meyve, yapısındaki yüksek orandaki fenolik maddelerin (Termentzi ve ark. 2008) yanı sıra, sorbitol (%10), şekerler, karotenoid bileşikleri ve C vitamini de içermektedir (Hakkinken ve ark. 1999, Ketenoglu ve ark. 2011).

Sorbus L. türleri üzerinde bugüne kadar yapılan fitokimyasal çalışmaların sonucunda izole edilen ve yapıları aydınlatılan fenolik bileşikler ve flavonoidler bulunmaktadır. Bulunan sonuçlara göre klorojenik ve diğer hidroksisinamik asitler, kuersetin, kamferol, seksangularetin, isorhamnetin, düşük miktarda antosiyanin (siyanidin türevleri) ve

prosiyanidinler bulunduğu belirtilmiştir (Nürnberg 1964, Pyysalo ve Kuusi 1974, Määttä-Riihinen ve ark. 2004, Olszewska 2008; 2009). *Sorbus* L. türleri üzerinde yapılan çalışmalarda; bu türün antidiabetik, idrar söktürücü, antienflamatuvar, damar açıcı/genişletici, vitamin ve antioksidan aktivite özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Kahkönen ve ark. 1999, Strzelecka ve Kowalski 2000, Hukkanen ve ark. 2006, Termentzi ve ark. 2006).

2.3.2. *Prunus* L. türleri:

***Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata* (Yunus Eriğı) ve *Prunus spinosa* L. (Çakal Eriğı)**

Rosaceae familyası *Prunus* L. cinsine ait olan *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* ve *Prunus spinosa* L. türleri halk arasında kiraz eriğı ve yabani erik, çakal eriğı olarak bilinmektedir. Eriğın birçok türü ılıman bölgelerde yetiştirilmektedir. *Prunus spinosa* L. türleri Avrupa, Kuzey Batı Afrika, Kafkasya, Türkiye; *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* türleri ise Balkanlar, Güney Batı ve Orta Asya, Türkiye olmak üzere dünyada çok geniş bir yayılış gösteren çok yıllık bir bitkidir. Erik meyvesi türlerde renk ve şekil bakımından farklılık gösterir. Şekilleri yuvarlak ya da uzunca olan meyveler yeşil-sarıdan mora kadar değışik renklerde olabilir. Meyve özellikleri bakımından farklı yerli tipleri de bulunmaktadır (Ketenoglu ve ark. 2011). *Prunus* L. türü meyvelerinin yapısında gallik asit, protokatekuik asit, p-kumarik asit, ellagik asit (Alañón ve ark. 2011), antosiyanidinler (siyanidin 3-rutinosit ve peonidin 3-rutinosit) (Usenika ve ark. 2009) ve kamferol, kuersetin glikozitler (Henning ve Herrmann 1980) bulunduğu belirtilmiştir.

2.3.3. *Diospyros* L. türleri:

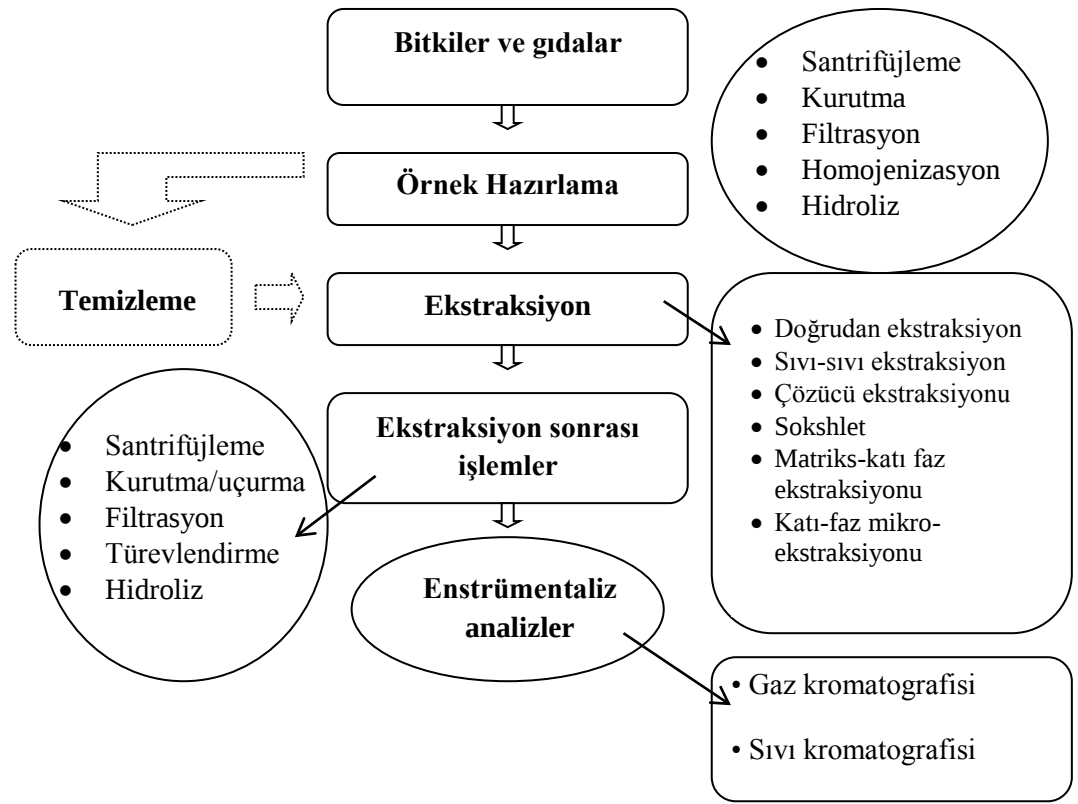
***Diospyros lotus* L. (Kara Hurma)**

Diospyros L. türleri Ebenaceae familyasından yaklaşık 500 kadar bitki türünü kapsayan bir cinstir. Bazı türleri hurma adlarıyla bilinir. Türkiye'de iki türü bulunur. Bunlardan kara hurma (*Diospyros lotus* L.) Kuzeydoğı Anadolu'da yetişir. Diğeri tür olan Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) ise kültür bitkisi olarak sonradan yayılmıştır (Ketenoglu ve ark. 2011, Baytop 1999). Meyvenin kimyasal içeriğı incelendiğinde bazı yağ asitleri, şekerler ve fenolik asitler; gallik asit, metilgallat, ellagik asit, kamferol, kuersetin, mirisetin, mirisetin 3-O- β -glukoronit ve mirisetin-3-O- α -ramnosit bulunmuştur.

Diospyros lotus L. sakinleştirici, kanamayı durdurucu, besleyici ve aynı zaman kabızlığı tedavi edici olduğu belirtilmiştir (Ahmet ve Kadioğlu 1998, Ayaz ve ark. 1995).

2.4. Analitik Yöntemler

Bitki örneklerinden fenolik bileşiklerin tayini ekstraksiyon işlemi ile başlar (Şekil 2.4.1.). Metanol, etanol, aseton, su, etil asetat, az miktarda kullanılan propanol, dimetilformamid ve bunların karışımları fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılır (Antolovich ve ark. 2000).



Şekil 2.4.1. Bitkilerde ve gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin tayin yöntemleri (Rostagno ve ark. 2009)

Ekstraksiyon işlemi gıdanın çeşidine, tayin edilmek istenen fenolik bileşiklere ve kullanılan analitik metoda bağlıdır (Lee ve Widmer 1996). Ekstraksiyon işleminde ilk basamak olan gıdanın ezilmesi, preslenmesi ya da öğütülmesi gıdanın yüzey alanını artırır ve böylece gıdanın ekstraksiyon çözeltisiyle daha iyi etkileşmesini sağlar (Waterman ve Mole 1994). Fenolik bileşiklerin çoğu glikozitleri ya da esterleri olarak

bulunduğu için, örnek hazırlama işleminde asidik, bazik ya da enzimatik hidrolizden yararlanılarak serbest fenolik bileşikler oluşturulmaktadır.

2.4.1. Ekstraksiyon işlemleri

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu kimyasal yapılarından, uygulanan ekstraksiyon metodundan, muhafaza süresi ve koşullarından ve girişim yapan maddelerin bulunmasına kadar pek çok faktörden etkilenir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler; fenolik asitler, kumarinler, flavonoidler, stilbenler ve ligninler olmak üzere oldukça geniş bir aralık içermektedir (Shahidi ve Nacz 2004). Fenolik bileşiklerin çözünürlüğü; çözücünün polaritesine, fenolikler maddelerin polimerizasyon derecesine ve diğer bileşiklerle olan etkileşimine göre değişir. Dolayısıyla bitkideki bütün fenolik bileşiklerin ya da belirli sınıf fenolik maddelerin ekstraksiyonu için tek bir metottan söz edilemez. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, sokslet ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu, katı-faz mikro-ekstraksiyonu ve matriks-katı faz ekstraksiyonu fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan ve bilinen klasik yöntemlerdir.

Ekstraksiyon süresini kısaltan, organik çözücü tüketimini azaltan, çevre kirliliğini önleyen yeni ekstraksiyon tekniklerine olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Antioksidan maddelerin bitkilerden ekstraksiyonunda kullanılan yeni tekniklerden ultrason destekli, mikrodalga destekli, süperkritik ve hızlandırılmış ekstraksiyon sistemleri oldukça hızlı ve etkilidirler. Bu tekniklerde yüksek basınç ve/veya yüksek sıcaklıklarda çalışma imkânının olması ekstraksiyon süresini büyük oranda azaltmaktadır (Wang ve Weller 2006, Perez-Serradilla ve ark. 2007, Tavman ve ark. 2009).

Ultrason destekli ekstraksiyon uygulamalarında yüksek yoğunlukta ve yüksek frekanstaki ultrason dalgalarının gıda materyali üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Vinatoru ve ark. 1999, Zhang ve ark. 2011) Ultrasona maruz kalan bitkisel dokularda fiziksel değişimler meydana gelmektedir (Mason 1998). Ultrason etkisiyle hücre duvarları hasar görerek doku içindeki ekstrakte edilebilir bileşenlerin ortaya çıkması ve bu maddelerin çözücü fazına geçmesini kolaylaştırmaktadır (Vinatoru 2001). Belirtilen özellik nedeniyle ultrason destekli ekstraksiyon metotları gelecekteki uygulamalar için önemli potansiyele sahiptir.

Ultrason destekli ekstraksiyon sistemi ucuz, basit ve verimli olması nedeniyle klasik ekstraksiyon tekniklerine iyi bir alternatiftir. Ultrasonun katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılmasının başlıca yararları hızlı kinetik ve verim artışıdır. Ayrıca ultrason, düşük sıcaklıklarda da etkin olarak uygulanabildiğinden sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstrakte edilmesini de mümkün kılar. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri gibi yeni tip ekstraksiyon sistemleriyle karşılaştırıldığında ultrason sistemi daha ucuz ve kullanımının kolay olması nedeniyle daha avantajlıdır (Tavman ve ark. 2009).

Ultrason destekli ekstraksiyon; yağ, esansiyel yağlar ve fenolik bileşikler gibi maddelerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Sharma ve Gupta tarafından yapılan çalışmada badem, kayısı ve pirinç kepeğinden yağın ekstrakte edilmesinde yüksek verim elde etmek için ultrason uygulamasının kritik ön işlem olduğu belirtilmiştir (Sharma ve Gupta 2004). Soyadan yağ ekstraksiyonunda ultrason uygulaması ekstraksiyon verimini önemli ölçüde arttırmıştır (Li ve ark. 2004).

Ultrason uygulaması ekstraksiyon kinetiğini ve ekstraktın kalitesini de artırır. Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada (2006) buğday kepeğinden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu işleminin optimizasyonu sonucunda en uygun işlemin %64'lük etanolle 60 °C'de 25 dakika süreyle uygulanan ultrasonik ekstraksiyonla elde edildiği vurgulanmıştır (Wang ve ark. 2008). Dereotundan ekstraksiyonda kullanılan ultrason destekli ekstraksiyon sisteminde alınan sonuçların klasik ekstraksiyona göre bir kaç kat daha hızlı olduğu bulunmuştur (Wang ve Weller 2006). Ultrason kolza, soya ve ayçiçeği gibi yağlı tohumlardan yağ ekstraksiyonunda da kullanılmıştır. Ultrason uygulamasının ekstrakte edilen yağ kompozisyonunda değişiklik olmadan işlem süresini yarıya indirdiği belirtilmiştir (Luque-García ve Luque de Castro 2004).

2.4.2. Hidroliz işlemleri

Fenolik bileşiklerin çoğu glikozitleri ya da esterleri olarak bulunduğu için, örnek hazırlama işlemi asidik, bazik ya da enzimatik hidroliz içererek fenolik bileşikleri serbest hale getirir. Eğer fenolik bileşikler türevleri halinde tayin edilmek istenirse hidroliz basamağı uygulanmaz.

Flavonol glikozitlerin çoğunun referans maddeleri olmadığı için kantitatif analizlerini yapmak zordur. Bitkilerde bulunan flavonolların miktar tayininde flavonol glikozitlerin hidroliz edilerek aglikonlarına dönüştürülmesi pratik olarak önerilen bir metottur (Hertog 1994, Robards ve Antolovich 1997). Asidik ya da bazik koşullar altında fenolik madde yapıları bozulmasına rağmen asidik ve bazik hidroliz, fenolik asitler serbest hale geçmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Asidik hidroliz metodu bitki ekstraktının ya da gıda örneğinin inorganik asit (HCl gibi) ile su ya da organik çözücü içerisinde belirli sıcaklıklarda muamele edilmesi ile yapılır. Çalışılan asit aralığı 1-2 N HCl ve reaksiyon süresi 30-60 dakikadır. Asidik hidroliz bitki matriksi ve flavonol bileşiğinin yapısı gibi birçok faktörden etkilenir (Hertog ve ark. 1992). Dolayısıyla farklı bitki örneklerinde flavonol glikozitlerin asidik hidrolizi için tek yöntem önermek zordur. Flavonoid glikozitlerin asidik hidrolizi için optimum şartların belirlenmesi; flavonoid çekirdeğindeki şekerin bağlanma pozisyonuna ve glikozitin kararlılığına göre değişir.

Bazik hidroliz ise numunenin 1-4 M NaOH çözeltisi ile muamele edilmesiyle yapılır. En yaygın reaksiyonlarda örnek oda sıcaklığında 15 dakikadan başlayan süreyle bir gece bekletilebilir. Yapılan bazı çalışmalarda reaksiyonların karanlıkta, argon ya da azot gazı gibi inert atmosfer altında yapılması gerektiğini belirtmiştir (Krygier ve ark. 1982). Benzoik ve sinamik asit esterlerinin bazik hidrolizi oda sıcaklığında 4-24 saat (Seo ve Morr 1984) ya da azot gazı ortamında 60°C de 90 dakika NaOH ile muamele edilerek yapılmıştır (Kuninori ve Nishiyama 1986). Bazik hidrolizin hidroksisinamik asit türevlerinde önemli derecede kayıplara sebep olduğu belirtilmiştir (Krygier ve ark. 1982) Yapılan başka bir çalışmada ise bazik hidroliz esnasında ortama eklenen askorbik asit (%1) ve etilendiamintetraasetik asidin (EDTA) (10 mM) fenolik asitlerin bozunmasını engellediği bulunmuştur (Nardini ve ark. 2002).

Glikozitlerin asit/baz hidroliz hızları kullanılan asit/baz gücüne, şekerin yapısına ve şekerde bulunan flavonoid çekirdeğinin pozisyonuna bağlıdır.

Diğer bir hidroliz tekniği olan enzimatik hidroliz, flavonoid O-glikozitlerinden monosakkaritlerin ayrılması için önerilen hızlı bir tekniktir. Enzimlerin en önemli özellikleri katalitik güçleri ve spesifiklikleridir. Kataliz enzimin özel bölgesi olan aktif

merkezde gerçekleşir. Enzimler, reaksiyonun denge sabitini değiştirmeden reaksiyon hızını arttırmaktadırlar (Aybastier 2010).

Enzimler reaksiyonun hızını arttırırken basınç, sıcaklık ve pH açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışmayı sağlarlar. Ayrıca en ucuz, en kolay bulunabilen çözücü olan su kullanılarak çalışmak enzimler ile mümkün olmaktadır. Enzimler hücre içinde üretilmelerine rağmen hücre dışında da etkinliklerini sürdürürler. Reaksiyonun türüne ve substrata oldukça spesifiktirler. Bu nedenle katalizledikleri reaksiyonlarda yan ürün oluşmaz ve yüksek verimle gerçekleşir (Aybastier 2010). Enzimlerin kimyasal katalizörlere olan bu üstünlükleri son yıllarda endüstride kullanımlarının yaygınlaşmasını sağlamıştır. Günümüzde enzimler en fazla ilaç ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadırlar.

Son yıllarda bitkilerden fenolik maddelerin izolasyonunda enzimatik hidroliz yöntemi sağladığı kolay uygulama ve yüksek verim gibi avantajlarıyla asidik hidroliz için alternatif bir yöntem olarak görülmektedir. Flavonol ve flavanol glikozitleri ya da antosiyaninler gibi farklı flavonoidlerden şeker yapılarının serbest kalması için ramnodiasas ve beta-glikozidaz enzimlerinin kullanıldığı belirtilmektedir (Harborne 1965). Meyve sularında hücre duvarı polisakkaritlerinin hidroliziyle polifenol gibi biyoaktif bileşiklerin serbest kalmasında pektinaz ya da sellüloz enzimleri kullanılmaktadır (Kapasakalidis ve ark. 2009). Versari ve arkadaşlarının (1997) yaptığı çalışmada ahududu meyvesinin ticari olarak alınan pektinaz enzimi ile muamele edilmesinden sonra kuersetin miktarında artış olduğu ve dolayısıyla pektinaz enziminin bir çeşit beta-glikozidaz aktivite gösterebildiği belirtilmiştir (Koponen ve ark. 2008).

2.4.3. Kromatografik teknikler

Fenolik bileşiklerde bulunan farklı yapısal grupları tayin etmek için kullanılan metotların dayandığı temel ilkeler birbirinden farklıdır. Kromatografik teknikler fenolik bileşiklerin ayrılması ve kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gaz kromatografisi (GC) fenolik asitlerin ve flavonoidlerin tayinlerinde kullanılan kromatografik tekniklerden biridir. Bitki ya da gıda örnekleri analize hazırlanma aşamasında glikoz ya da ester içeren fenolik bileşikler asit (Zadernowski 1987), baz (Krygier ve ark. 1982) ya da enzim (Liggins ve Bluck 1998) hidrolizi ile serbest hale

getirilir. Fenolik bileşikler; GC ile analiz öncesinde, metilleme (Kosuge ve Furuta 1970), trifloroasetilleme (Sweeley ve ark. 1963) ve trimetilsilil (Krygier ve ark.1982) gibi uçucu türevlerine dönüştürülürler. Ancak bu işlem esnasında fenolik bileşikler için uygun türevlendiricilerin seçilememesi ya da yeterince türevlerine dönüştürülememesi GC ile tayinlerini kısıtlayabilmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği ise fenolik bileşiklerin ayrılmasında ve miktar tayinlerinde son yıllarda tercih edilen tekniktir.

2.5. Antioksidan Kapasite Tayin Metotları

Organizmada; normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çevresel etkenler (pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler vb.), stres, radyasyon gibi çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir. Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü, reaktif moleküllerdir. Serbest radikallerin en önemlileri süperoksit radikali ($O_2^{\bullet}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$), singlet oksijen (1O_2) ve radikalik olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) olup “reaktif oksijen türleri (ROS)” olarak bilinirler. Reaktif oksijen türleri DNA, protein ve lipid gibi makromolekülleri etkileyerek oksidatif hasara neden olurlar. Normal olarak reaktif oksijen türleri spesifik enzim sistemleri (süperoksit dismutaz ve katalaz), suda ve yağda çözünebilen bazı protein yapısında olmayan bileşikler (ürik asit ve tokoferol) tarafından engellenmektedir (Lichtenthaler ve ark. 2003). Bu reaktif oksijen türlerinin antagonistleri vücudun reaktif oksijen türlerini temizleyici antioksidanlarıdır. Antioksidanlar küçük miktarlarda, kolayca okside olabilen materyallerin oksidasyonunu büyük ölçüde geciktiren ya da engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır (MacDonald-Wicks ve ark. 2006). Antioksidanlar tarafından sunulan koruma sınırlıdır. Eğer reaktif oksijen türleri oluşumu biyolojik sistemlerin antioksidan kapasitesini aşarsa oksidatif stres oluşur. Bu nedenle gıdalarla antioksidanların vücuda alınımı kanser, kardiovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları önlemede ve yaşlanma sürecini geciktirmede önemli rol oynamaktadır (Lichtenthaler ve ark. 2003, Price ve ark. 2006).

Antioksidanlar mekanizmalarına göre genel olarak 2 sınıfa ayrılırlar. Radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmesini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşikler (katalaz, peroksidaz, metal şelatlaştırıcılar) birinci grup

olan “Birincil Antioksidanları”, oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran bileşikler (askorbik asit, α -tokoferol, flavonoidler, polifenoller) ikinci grup olan “İkincil Antioksidanları” oluşturlar (Sertsever ve Gök 2003).

Antioksidan kapasite tayin metotları reaksiyon türlerine göre;

- Elektron transferine dayanan metotlar
- Hidrojen atomu transferine dayanan metotlar

olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Özyürek ve ark. 2011). Elektron transferine dayanan yöntemlerin temelinde antioksidanın, bir oksidan tarafından yükseltgenmesi sonucunda bir elektron antioksidandan oksidana transfer edilir, bu da oksidanın renk değişimine neden olur. Elektron transferine dayanan antioksidan kapasite metotları; ABTS, DPPH, CUPRAC, CHROMAC ve FRAP’dır. ORAC ve TRAP gibi hidrojen atomu transferi temelli metotların birçoğu azobileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır.

2.5.1. ABTS metodu

Bitki ve gıdaların toplam antioksidan aktivite ölçümleri için kullanılan ABTS metodu (2,2’-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) ve potasyum persülfat arasındaki reaksiyon sonucu oluşan mavi/yeşil renkli ABTS⁺ radikal katyonunun (Wolfenden ve Willson 1982) spektrofotometrik ölçüm temeline dayanır (Miller ve ark. 1996, Rice-Evans ve ark. 1996). ABTS radikal katyonu sulu ya da organik ortamda enzimatik ya da kimyasal reaksiyonla oluşturulabilir. ABTS metodu ile lipofilik ve hidrofilik antioksidanların aktivite ölçümü yapılabilir. Bu metodun uygulanabilirliği kolay ve hızlıdır (Prior ve ark. 2005, Wojdylo ve ark. 2007).

2.5.2. DPPH metodu

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali herhangi bir özel hazırlama gerektirmez ve sadece organik çözücülerde çözünür. DPPH metodu ile polar olmayan/az polar ve polar maddelerin/ekstraktların aktivite ölçümü yapılabilir (Sharma ve Bhat 2009). Flavonoidler ve diğer kompleks fenoller DPPH[•] serbest radikale yavaş reaksiyon gösterirler (Schaich 2010). Işıktan, oksijenden ve reaksiyon ortamının pH değerinden etkilenir. Basit, pahalı reaktiflere ihtiyaç olmadığından kolay bir metottur (Sharma ve Bhat 2009). Ayrıca fenolik maddelerin sahip oldukları hidroksil grubu sayısıyla DPPH

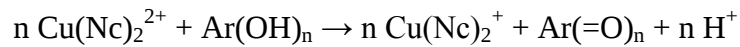
antioksidan kapasiteleri arasında pozitif korrelasyon olduğu belirtilmektedir (Sroka ve Cisowski 2003).

2.5.3. FRAP metodu

FRAP (Fe(III) İyonu İndirgeme Gücü) metodunda; düşük pH'da ferrik tripiridiltiazin kompleksi (Fe^{3+} -TPTZ) antioksidanların etkisiyle ferröz kompleksine (Fe^{2+} -TPTZ) indirgenir. Oluşan kompleksin 593 nm'de absorbanı ölçülür. Böylece elektron vermenin antioksidanların toplam indirgeme kapasitesiyle lineer olduğu varsayılır. Bu yaklaşımın ana dezavantajı, metod okside olabilen bir substrat içermediğinden antioksidanların koruyucu özellikleri hakkında bilgi sağlamamasıdır (Benzie ve Strain 1996, Huang ve ark. 2005). FRAP metodu asidik ortamda (pH 3,6) çalışır, fizyolojik pH da çalışmaz dolayısıyla insan vücudunda meydana gelen redoks reaksiyonlarının antioksidan kapasite değerini tahmin edemez. FRAP metodu basit, hızlı, ucuz olmasına rağmen; bazı antioksidanları (hidroksinamik asit ve flavonoidler) reaksiyon süresince tam yükseltgeyemediği ve glutatyon gibi tiol tipi antioksidanları ölçemediği bildirilmektedir (Apak ve ark. 2007).

2.5.4. CUPRAC metodu

Bakır iyonu indirgeme kapasitesi (CUPRAC) metodu; bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini olarak tanımlanır. Spektrofotometrik metot, antioksidan çözeltisinin, bakır(II) klorür çözeltisi, neokuproinin alkoldeki çözeltisi ve pH 7 amonyum asetat sulu tampon çözeltisi ile karıştırılması ve ardından oluşan Cu(I)-neokuproin kelatının absorbanının 450 nm de okunmasını içerir (Apak ve ark. 2007).



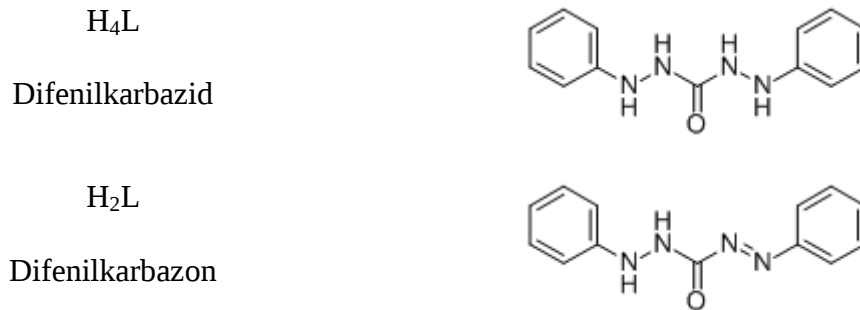
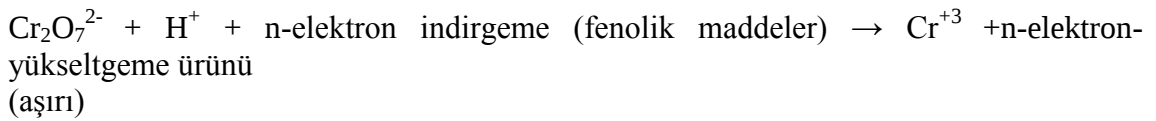
Metod, hızlı, basit ve kullanışlıdır. Cu(II)-neokuproin reaktifi ılımlı bir yükseltgen olduğundan, gıda maddelerinde bolca bulunan sitrat ve glukoz gibi bileşenlerle tepkime vermeksizin sadece antioksidantları yükseltger ve reaksiyonun ürünü Cu(I)-neokuproin kelatının 450 nm'deki absorbanı okunarak sonuç verilir. (-SH) tipi antioksidantlara çabuk ve net sonuçlara ulaşılır. CUPRAC, fizyolojik pH'lara yakın olan pH 7 ortamında yürütülür; dolayısıyla fizyolojik koşulları yansıtmaya şansı daha fazladır. Uygun çözücü sistemiyle hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar tayin edilebilir (Güçlü ve ark. 2006).

2.5.5. Cr (VI) antioksidan kapasite (CHROMAC) metodu

Bu çalışmada, Cr(VI)'nın asidik ortamda organik maddeleri yükseltgeme ve 1,5-difenilkarbazid ile indirgenme sonrası [1,5 difenilkarbazid 1,5-difenilkarbazona yükseltgenirken Cr(VI) da Cr (III)'e indirgenmektedir] kararlı diaquabis (1,5-difenilkarbazon) krom(III) kompleksi oluşturma özelliğinden yararlanılmıştır (Gündüz 1985). Bu amaçla geliştirilen metotda, organik madde üzerine aşırı Cr(VI) çözeltisi (pH=2,6 tampon ortamında) eklendikten sonra geriye kalan (organik madde ile yükseltgenme-indirgenme tepkimesi vermeyen) serbest halde ortamda bulunan Cr(VI)'nın indirgenme sonrası 1,5-difenilkarbazid ile oluşturduğu komplekse ait elektronik absorpsiyon 540 nm de okunmaktadır. Kompleksin absorbans değeri Cr(VI) konsantrasyonu ile ilişkilidir. Buna göre hazırlanan kör örneğin absorbans (aşırı Cr(VI) çözeltisinin 1,5-difenilkarbazid ile oluşturduğu kompleksin absorbansı) değerinden örnek için okunan absorbans değeri matematiksel olarak çıkartılır. Bu absorbans farkından örneğin antioksidan kapasite değerini belirlenir (Işık ve ark. 2013). Difenilkarbazid ve difenilkarbazona ait kimyasal yapılar Şekil 2.5.5.1.'de gösterilmektedir.

$$A_{\text{Örnek}} = A_{\text{Blank}} - A_{\text{Geriye kalan}}$$

Burada A_{Blank} kör örneğin absorbansıdır (aşırı Cr(VI) çözeltisinin 1,5-difenilkarbazid ile oluşturduğu kompleksin absorbansı). $A_{\text{örnek}}$ ise örnek için okunan absorbans değeridir.



Şekil 2.5.5.1. Difenilkarbazid ve difenilkarbazona ait kimyasal yapılar

2.5.6. TRAP metodu

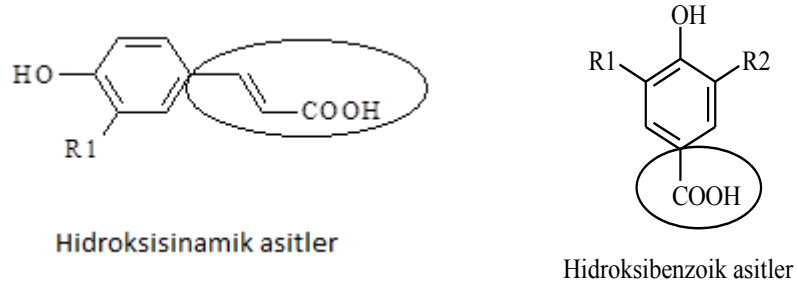
TRAP (Toplam Radikal Tuzaklayıcı Antioksidan Parametre) metodu; plazma ve serumun “toplam antioksidan kapasitesi”ni ölçmek için geliştirilmiştir. Bu metod plazma antioksidanlarını okside etmek için ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorit) radikal başlatıcısı tarafından peroksil radikallerinin üretilmesi ve meydana gelen oksidasyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülerek izlenmesine dayanır. Daha sonra metod, oksitlenebilir bir lipid substratı olan linoleik asidin eklenmesiyle modifiye edilmiştir (Frankel ve Meyer 2000). Modifiye metotta Cu^{2+} ya da bir azo başlatıcısı ile linoleik asit oksidasyonu yapay olarak indüklenir, otooksidasyonun ilerleyişi linoleik asit oksidasyonundan oluşan konjuge dienperoksitlerin absorbansının takibi ile izlenir (Huang ve ark. 2005). TRAP metodu suda çözünebilen peroksil radikallerinin üretimi ve lipid peroksidasyonunun başlatılması ile alakalıdır ve bilinen tüm zincir kırıcı antioksidanlara hassastır. Fakat yöntem zaman gerektiren oldukça kompleks bir metod olup; oldukça fazla tecrübe gerektirmektedir (Prior ve ark. 2005).

2.5.7. ORAC metodu

ORAC (Oksijen Radikalini Absorblama Kapasitesi) metodu; çeşitli ekstraktlar ve fitokimyasalların antioksidan aktivitesini ölçmek için kullanılır. Metodun ilk halinde prob olarak floresan, bir protein olan β -fikoeritrin (β -PE) ile ve peroksil radikal başlatıcısı olarak AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorit) bileşiği ile çalışılmıştır. Ancak β -PE'nin fotolitik olarak kararlı olmaması, polifenolik maddelerle etkileşimi ve radikal başlatıcı eklenmediğinde bile fluoresansının azalması dezavantajlarıyla karşılaşmış ve sonraları ORAC metodu, prob olarak β -PE yerine floressein kullanılarak geliştirilmiştir. Floressein (FL, 3',6'-dihidroksispiro [izobenzofuran-1[3H], 9'[9H]-ksanten]-3-on) protein olmayan sentetik bir probdur (Becker ve ark. 2004). Bu metotta radikal başlatıcı olan AAPH, floressein veya β -PE'nin fluoresansında azalmaya neden olur. Reaksiyon ilerledikçe floressein veya β -PE tüketilir. Antioksidan varlığında AAPH radikalleri giderilir ve fluoresans azalması inhibe edilir (Tomer ve ark. 2007). Bu metod hem lipofilik hem de hidrofilik ekstraktların antioksidan kapasitesinin ölçülmesini mümkün kılar. Aynı zamanda farklı radikal kaynaklar kullanılabilir (Ou ve ark. 2002, Ellefson ve ark. 2006).

2.6. Kimyasal Yapının Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi

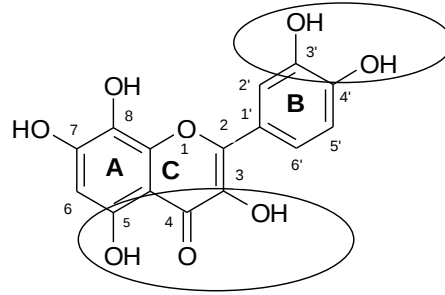
Fenolik asitlerin ve flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri; aromatik halkaya bağlanan hidroksil grubu sayısına ve hidroksil gruplarının pozisyonuna göre değişiklik göstermektedir (Cuvelier ve ark. 1992, Sroka ve Cisowski 2003). Sinamik asit türevlerinin antioksidan aktivitelerinin benzoik asit türevlerinden daha fazla olduğu belirtilmiştir ve bu durum sinamik asitlerin propenoik asit ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$) kısmının benzoik asitlerin karboksil gruplarından ($-\text{COOH}$) daha fazla antioksidan etkiye sahip olmasıyla açıklanmıştır (Cuvelier ve ark. 1992). Ayrıca fenolik bileşiklerin *orto* ya da *para* pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının hidrojen atomlarını serbest radikallere daha kolay vermesi (de Heer ve ark. 1999) ve birbirleriyle etkileşimde olmaları antioksidan aktivite üzerinde *meta* pozisyonunda bulunan hidroksil gruplarına göre daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir (Sroka ve Cisowski 2003). Yapılan çalışmalarda, benzoik ve sinamik asit türevlerinin, flavonolların ve antosiyanidinlerin aromatik halkaya bağlı hidroksil grubu sayısı arttıkça antioksidan aktivitelerinin de arttığını göstermektedir (Fukumoto ve Mazza 2000). Hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asitlere serbest radikal süpürme özelliği veren yapılar Şekil 2.6.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.6.1. Hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asitlere serbest radikal süpürme özelliği veren yapılar

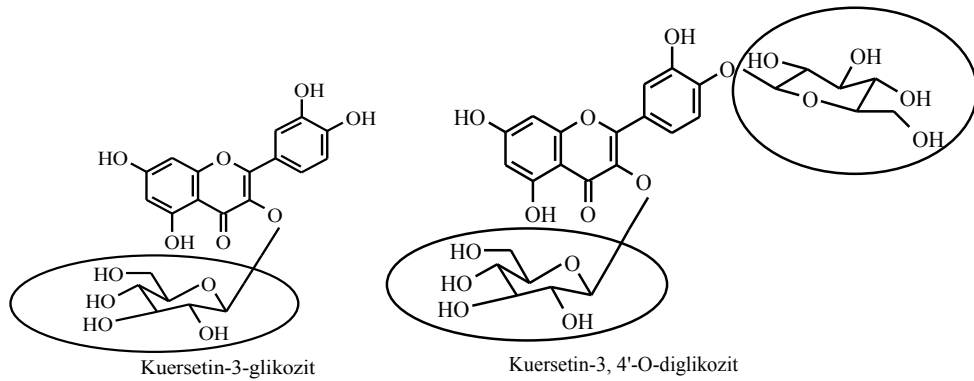
Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi, hidrojen bağları veya elektron dekolizasyonu sonucu oluşan fenoksil radikallerinin dengelenmesi ve fenolik hidrojenlerinin uygunluğu ile tayin edilir. Flavonoidlere antioksidan aktivite özelliği kazandıran yapılar belli bir sayı, düzen ve fenol halkasında bulunan hidroksil gruplarının yapısal konjugasyonunu içerir (Miller ve Rice-Evans 1996). Flavonoidlerin antioksidan aktivitelerinde yapıların “B” halkasında bulunan 3,4-dihidroksil grubu, “C” halkasında bulunan 3 numaralı karbona bağlı OH grubu ve 4 numaralı karbonla çift bağ yapan

oksijen ve “A” halkasında bulunan 5 numaralı karbona bağlı OH grubu etkili olduğu belirtilmektedir (Wojdylo ve ark. 2007) (Şekil 2.6.2.).



Şekil 2.6.2. Flavonoidlere serbest radikal süpürme aktivitesi özelliği veren yapılar

Hidroksil gruplarının düzenlenmesindeki değişiklik ve hidroksil gruplarına glikozil yapılarının bağlanması flavonoidlerin antioksidan aktivitelerini düşürmektedir (Rice-Evans ve ark. 1996). Flavonollarla ilgili yapılan bir çalışmada kuersetinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Ancak, kuersetinin 3-hidroksil grubuna glikozil yapısının bağlanmasıyla oluşan rutin yapısının oldukça düşük aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışma da ise kuersetin, siyanidin, pelargonidin ve peonidinin glikozil yapılarının aglikonlarından daha düşük aktiviteye sahip olduğu ve eklenen ikincil glikozil yapılarının aktiviteyi daha fazla azalttığı bulunmuştur (Şekil 2.6.3). Antioksidan etkinin bu azalışı karbonhidrat kısmının sebep olduğu sterik etkiyle açıklanmaktadır.



Şekil 2.6.3. Antioksidan kapasiteyi azaltıcı yönde etki eden glikozit ve diglikozit yapılar

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bazı yabani meyvelerdeki fenolik maddelerin kantitatif tayinlerine uygun örnek hazırlama ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanılarak tayin yöntemi geliştirilmek amacıyla Bursa’da doğal yetişen *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., türü meyveler çalışmamızda kullanılmıştır.

3.1.1. Çalışmada kullanılan yabani meyveler

Bu çalışmada; Bursa da yayılış gösteren *Sorbus domestica* L. (Üvez), *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. var *orientalis* (Pitlicen, Akçaağaç Yapraklı Üvez); *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata* (Yunus Eriği); *Prunus spinosa* L. (Çakal Eriği); *Diospyros lotus* L.(Kara hurma, Hırnık), olmak üzere 5 tür yabani meyve analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Bu yabani meyveler Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hulusi MALYER tarafından belirtilen doğal alanlardan toplanmış ve teşhis edilmiştir.

3.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi diod serili dedektör

Yabani meyve türlerinde bulunan fenolik bileşikler HPLC-DAD (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile analiz edildi. Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile analizinde, Agilent 1200 HPLC system (Waldbronn, Almanya) model kullanıldı.

3.1.3. Ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi

Çalışmada Varian marka Cary-50 Conc model UV/VIS (Mor ötesi-görünür bölge spektrofotometre) spektrofotometre kullanıldı. Ölçümler 10 mm kuvarz hücreler kullanılarak yapıldı. Analiz sırasındaki çalışma şartları Çizelge 3.1.3.1.’de verilmiştir.

Çizelge 3.1.3.1. Varian marka Cary-50 Conc cihazının çalışma şartları

Ölçüm Birimi	Absorbans
Ölçüm Aralığı (Absorbans)	Alt değer: 0,0 Üst değer: 3,0
Dalgaboyu Aralığı (nm)	200-800
Tarama Hızı	0,5 nm aralıklı
Örnekleme Aralığı	Otomatik

3.1.4. pH metre

Çalışmada HANNA model HI 221 model pH metre kullanılmıştır.

3.1.5. Analitik terazi

Deneyisel çalışmalar sırasında çözelti hazırlama işlemleri için $\pm 0,0001$ g hassasiyetle çalışan Radwag AS 220/C/2 marka analitik terazi kullanılmıştır.

3.1.6. Saf su cihazı

Analizler sırasında kullanılan su, ELGA marka Purelab Option DV 25 model saf su cihazından (iletkenliği $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$) sağlanmıştır.

3.1.7. Çoklu manyetik karıştırıcı

Deneyisel çalışma sırasında örneklerin ekstrakte edilebilmesi için Daihan marka MS-MP8 model çoklu manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.8. Ultrasonik banyo

Deneyisel çalışma sırasında örneklerin ekstrakte edilebilmesi için UTB marka ultrasonik banyo kullanılmıştır.

3.1.9. Etüv

Deneyisel çalışmalar sırasında kurutma işlemleri için VWR marka DL-53 model etüv kullanılmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

3.2.1. Analitik saflıktaki kimyasallar

- Merck, 1.06007.2500, Metanol
- Merck, 1.11727.2500, Etanol
- Merck, 1.00030.2500, Asetonitril
- Merck, 1.00264.1000, Formik asit
- Merck, 1.06393.1000, Sodyum karbonat
- Merck, 1.06469.1000, Sodyum hidroksit
- Merck, 1.02791.1000, Bakır sülfat
- Merck, 1.08087.1000, Sodyum potasyum tartarat
- Merck, 1.065490.100, Sodyum nitrit
- Merck, 1.01084.1000, Alüminyum klorür hekzahidrat

- Merck, 1.02733.1000 Bakır klorür
- Merck, 1.01116.1000 Amonyum asetat
- Merck, 8.18401.0500, Potasyum persülfat
- Sigma–Aldrich, 207802, Potasyum dikromat
- Merck, 102487, Krom(III) klorür heksahidrat
- Merck, M1067170250, Nikel (II) klorür heksahidrat
- Merck, M1044190250, Civa (II) klorür
- Sigma–Aldrich, 259225, 1,5-difenilkarbazid
- Sigma–Aldrich, 71500, Sodyum fosfat dihidrat
- Merck, 100573, Ortofosforik asit, % 85.
- Merck, 1.00314.2500, Derişik hidroklorik asit, %37, d=1,19 g/mL, M=36,46 g/mol

3.2.2. Diğer kimyasallar

- Fluka, 45140, Ellagik asit
- Fluka, 70050, Mirisetin
- Merck, 822029, Kafeik asit
- Merck, 800237, *p*-Kumarik asit
- Merck, 822070, Ferulik asit
- Merck, 821840, *p*-Hidroksibenzoik asit
- Merck, 841533, Protokatekuik asit
- Sigma–Aldrich, G7384, Gallik asit
- Sigma–Aldrich, 337951, Kuersetin hidrat
- Sigma–Aldrich, R5143, Rutin hidrat
- Sigma–Aldrich, 536954, Rosmarinik asit
- Sigma–Aldrich, C3878, Klorojenik asit
- Sigma–Aldrich, H22809, 2-hidroksisinamik asit
- Sigma–Aldrich, 17793, Isokuersitrin
- Sigma–Aldrich, 68437, Kamferol glikozit
- Sigma–Aldrich, C-1251, (+)-Kateşin hidrat
- Sigma–Aldrich, E-1753, (-)-Epikateşin
- Sigma–Aldrich, 72511, Luteolin
- Sigma–Aldrich, 94770, Vanilik asit
- Sigma–Aldrich, 238813, Troloks
- Sigma–Aldrich, 168149, Sistein
- Sigma–Aldrich, PHR1359, Glutatyon
- Sigma–Aldrich, U2625, Ürik asit
- Sigma–Aldrich, B1215000, Butilhidroksitoluen
- Sigma–Aldrich, C83155, Sitrik asit
- Sigma–Aldrich, G0350500, Glukoz
- Sigma–Aldrich, 410225, Glisin
- Sigma–Aldrich, W373605, Tirozin
- Sigma–Aldrich, 79457, Siyanidin klorid
- Sigma–Aldrich, P1659, Pelargonidin klorid
- Sigma–Aldrich, 43725, Delfinidin klorid
- Extrasynthese, 0915S, Siyanidin-3-O-glikozid klorid
- Extrasynthese, 0914S, Siyanidin-3-O-rutinosid klorid
- Extrasynthese, 0907S, Pelargonidin-3-O-glikozid klorid

- Sigma–Aldrich, F9252, Folin-Ciocalteu fenol reaktifi
- Merck, 102968, Neokuproin reaktifi
- Sigma-Aldrich, A1888, 2,2-azino-di-(3-ethylbenzothialozine-sulphonic acid) (ABTS)

3.2.3. Sarf malzemeler

- 10-100 µL aralıklı mikropipet (Eppendorf marka)
- 100-1000 µL aralıklı mikropipet (Eppendorf marka)
- 500-5000 µL aralıklı mikropipet (Eppendorf marka)
- Supelco hidrofilik 0,45 µm'lik PVDF enjektör tipi filtre kartuş

3.2.4. Standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diod serili dedektör (HPLC-DAD) cihazı için standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. 100 mg/L stok çözelti kullanılarak kuersetin, rutin, rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit, vanilik asit, ellagik asit, gallik asit, para-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit, 2-hidroksisinamik asit, isokuersitrin, kamferol glikozit, mirisetin, luteolin, (+) kateşin, (-) epikateşin ve kamferol standart fenolik bileşikler için 1, 2, 4, 8, 10, 20, 50 ve 100 mg/L derişimlerinde çözeltileri hazırlanmıştır. Ek olarak; antosiyanin ve antosiyanidin tayini için 100 mg/L stok çözelti kullanılarak siyanidin, delfinidin, pelargonidin, siyanidin glikozit, siyanidin rutinosit, pelargonidin glikozit 1, 5, 10, 20, 40, 70, 100 mg/L derişim aralığında standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin tamamı metanolde çözülerek hazırlanmıştır. Ekstraksiyon yönteminin geri kazanım değerinin ve uygulanan analitik yöntem validasyonunun hesaplanabilmesi için kullanılan çözeltiler, 100 mg/L stok çözelti ile hazırlanmıştır. Bu çözeltiden % geri kazanım değerinin hesaplanmasında içerisinde 10 mg/L standart madde içeren ekstraktlar kullanılmıştır. Bu ekstraktlar, *Prunus spinosa* L. türünün metanol ve metanol-asit ekstraktlarıdır. Uygulanan analitik yöntem validasyonunda kullanılan çözeltiler stok çözelti kullanılarak her bir standart fenolik bileşik için 1 mg/L derişiminde çözeltilerdir.

3.2.5. Asidik hidroliz için kullanılan çözelti

Çalışmada, örneklerin asidik hidrolizi için derişik hidroklorik asitten (%37, d=1,19 g/mL, M=36,46 g/mol) 50 mL alınarak saf su ile 100 mL seyreltilmiş ve konsantrasyonu 6,04 mol/L olan çözelti hazırlanmıştır.

3.2.6. Bazik hidroliz için kullanılan çözelti

Çalışmada, örneklerin bazik hidrolizi için 12,000 g NaOH suda çözülerek 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır ve konsantrasyonu 3,001 mol/L olan çözelti hazırlanmıştır.

3.2.7. Enzimatik hidroliz için kullanılan çözelti

Çalışmada, örneklerin enzimatik hidrolizi için ekstraksiyon ortamında % 2 β -glukozidaz enzim çözeltisi olacak şekilde pH 5 asetat tamponu ve su ile iki ayrı çözelti hazırlanmıştır.

3.2.8. Toplam fenol, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi: 0,4000 g NaOH suda çözülerek 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.
- %2 (w/v) sodyum karbonat çözeltisi: 2,0000 g Na_2CO_3 suda çözülerek 100 mL'ye saf su ile seyreltilir.
- %0,5 (w/v) bakır sülfat çözeltisi: 0,5000 g CuSO_4 suda çözülerek 100 mL'ye saf su ile seyreltilir.
- %1 (w/v) sodyum potasyum tartarat çözeltisi: 1,0000 g sodyum $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ suda çözülerek 100 mL'ye saf su ile seyreltilir.
- %5 (w/v) sodyum nitrit çözeltisi: 5,0000 g NaNO_2 suda çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilir.
- %10 (w/v) alüminyum klorür çözeltisi: 10,0000 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ suda çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilir.
- 1 M sodyum hidroksit çözeltisi: 4,0000 g NaOH suda çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilir.
- 7mM ABTS çözeltisi: 0,1920 g ABTS tartılır suda çözülür 0,0331 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ilave edilerek karıştırılır 50 mL ye saf su ile seyreltilir, karanlıkta 12-16 saat bekletilir.
- $1,0 \times 10^{-3}$ M troloks çözeltisi: 0,025 g troloks metanolde çözülerek 100 mL' ye metanol ile seyreltilir.
- $1,0 \times 10^{-2}$ M bakır klorür çözeltisi: 0,4262 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ suda çözülerek 100 mL'ye saf su ile seyreltilir.

- $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi: 0,0390 g neokuproin %96'lık etanolde çözülerek 25 mL'ye etanol ile seyreltilir.
- 1 M amonyum asetat çözeltisi: 19,27 g NH_4Ac suda çözülür ve 250 mL ye saf su ile tamamlanır.
- 10 mM pH=2,6 sodyum fosfat tampon çözeltisi: 0,076 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ suda çözülür, %85 lik H_3PO_4 çözeltisinden 34 μL ilave edilerek 100 mL'ye saf su ile seyreltilir.
- $3,4 \times 10^{-4}$ M 1,5-difenilkarbazid çözeltisi: 0,1 g 1,5-difenilkarbazid tartılarak %70 etanol ve %30 su karışımı ile çözülür. Hazırlanan çözeltiden istenen konsantrasyonda çözelti hazırlığında su ile seyreltme yapılır.
- 100 mg/L potasyum dikromat çözeltisi: 0,1 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilir.
- pH 5 tamponu: 2,86 mL derişik CH_3COOH çözeltisinden alınmış saf su ile balon jojede 50 mL'ye tamamlanmıştır. 3,69 mL 1 M CH_3COOH ve 0,864 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ suda çözülerek hacmi saf su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanır.

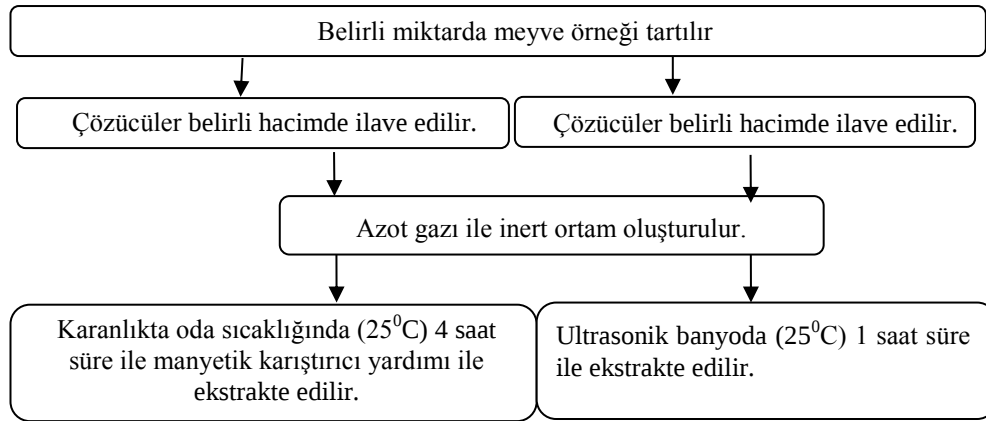
3.3. Yöntem

3.3.1. Meyvelerin toplanması ve analize hazırlanması

Rosaceae familyasında yer alan *Sorbus domestica* L.; İnegöl-Alaçam altı ($40^0 10' 17''$ N ve $28^0 18' 14''$ E) (03.09.2012); *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. var *orientalis*; Alaçam köyünden ($40^0 09' 45''$ N ve $29^0 18' 05''$ E) (12.10.2012); *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*; Uludağ Üniversitesi Görükle kampüsünden ($40^0 13' 33''$ N ve $28^0 52' 07''$ E) (03.09.2012); *Prunus spinosa* L.; Mudanya Söğütpınar köyü ($40^0 21' 34''$ N ve $28^0 38' 41''$ E) çalılık içlerinden (15.09.2012); Ebenaceae familyasında yer alan *Diospyros lotus* L., türü de yine İnegöl Alaçam'dan ($40^0 09' 45''$ N ve $29^0 18' 05''$ E) (27.11.2012) temin edilmiştir. Toplanan bu türler ileriki ekstraksiyon çalışmalarımız için taze olarak poşetlendikten sonra buzdolabında -24°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2. Ekstraksiyon çalışmaları

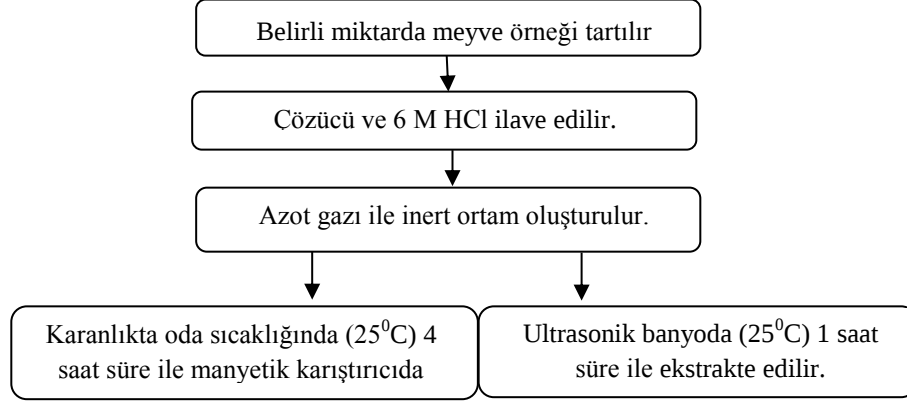
Buzdolabında -24°C’de muhafaza edilen *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L. türlerinin meyveleri, çekirdekleri çıkarıldıktan sonra blenderdan geçirilerek meyvelerin homojen olarak parçalanması sağlanmıştır. Homojenize edilen örneklerden belirli miktarlarda tartılarak çözücü ekstraksiyonu ve ultrasonik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Örneklerin farklı çözücüler ile ekstraksiyonları iki farklı şekilde yapılmıştır.



Şekil 3.3.2.1. Meyvelerin çözücü ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan çözücüler; su, metanol, etanol, %20-80 (v/v) su-metanol, %30-70 su-metanol (v/v), %50-50 su-metanol (v/v), %80-20 su-metanol (v/v), %70-30 su-metanol, %20-80 su-etanol, %30-70 su-etanol, %50-50 su-etanol, %80-20 su-etanol, %70-30 su-etanol (v/v) dur. Ancak ekstraksiyon çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde, farklı oranlarda hazırlanan ekstraksiyonlar arasında çok fark olmadığı görülmüştür. En yüksek verimin ise %50-50 (v/v) su-metanol/etanol ekstraktında elde edildiği bulunmuştur ve bu değerlendirme bazı bilimsel sunumlarda gösterilmiştir (EK 3). Ekstraksiyon çalışmaları sonunda her bir meyve türü için iki farklı ekstrakt elde edilerek işlemler değerlendirilmiştir.

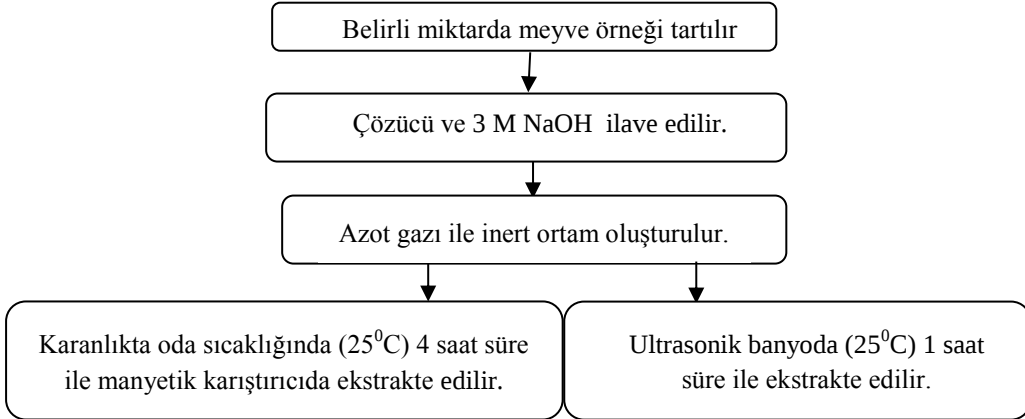
3.3.3. Asidik Hidroliz



Şekil 3.3.3.1. Meyvelerin asidik hidroliz ekstraksiyonu

Sorbus torminalis L., *Sorbus domestica L.*, *Prunus spinosa L.*, *Prunus divaricata Ledeb.subsp. divaricata.*, *Diospyros lotus L.* meyveleri için kullanılan çözücüler 6 M HCl ile muamele edilerek çözücü ve ultrasonik ekstraksiyon basamakları için Şekil 3.3.3.1’de gösterildiği gibi asidik hidroliz ekstraktları elde edilmiştir.

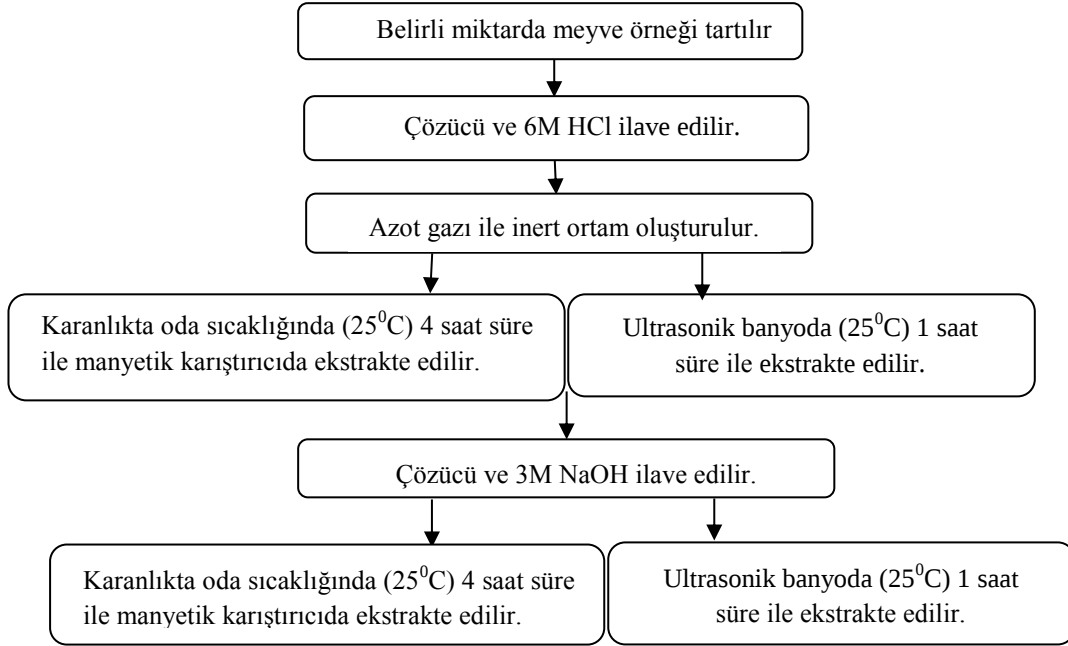
3.3.4. Bazik Hidroliz



Şekil 3.3.4.1. Meyvelerin bazik hidroliz ekstraksiyonu

Prunus spinosa L. meyveleri için kullanılan çözücüler 3 M NaOH ile muamele edilerek çözücü ve ultrasonik ekstraksiyon basamakları için Şekil 3.3.4.1’de gösterildiği gibi bazik hidroliz ekstraktları elde edilmiştir.

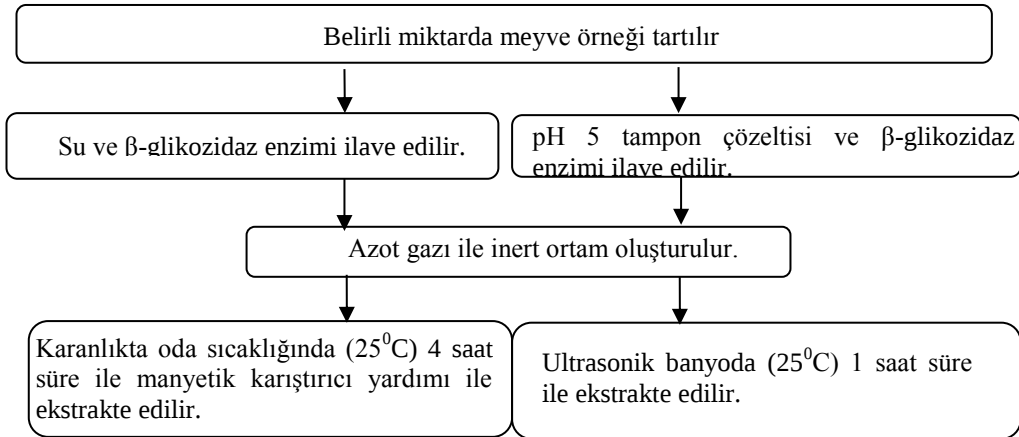
3.3.5. Asidik Bazik Hidroliz



Şekil 3.3.5.1. Meyvelerin asidik bazik hidroliz ekstraksiyonu

Prunus spinosa L. meyveleri için kullanılan çözücüler sırasıyla 6 M HCl ve 3 M NaOH ilave edilerek çözücü ve ultrasonik ekstraksiyon basamakları için Şekil 3.3.5.1’de gösterildiği gibi asidik bazik hidroliz ekstraktları elde edilmiştir.

3.3.6. Enzimatik Hidroliz



Şekil 3.3.6.1. Meyvelerin enzimatik hidroliz ekstraksiyonu

Sorbus L., *Prunus* L., ve *Diospyros* L., meyveleri çözeltisi pH 5 tamponu ve su ortamında ayrı ayrı β-glikozidaz enzimi ile muamele edilerek çözücü ve ultrasonik

ekstraksiyon basamakları için Şekil 3.3.6.1’de gösterildiği gibi enzimatik hidroliz ekstraktları elde edilmiştir.

3.3.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışma koşulları

Çalışılan yabancı meyve türlerinde mevcut olan fenolik bileşikler HPLC-DAD ile analizinde kolon olarak XBridge C18 (4,6×250mm, i.d. 3,5 µm, Waters) kolon ile 10 µL lik enjeksiyon hacminde 0,5 mL/dak akış hızı ile 35 dakikalık programda çalışılmıştır. Program literatürden yararlanılarak, çalışmada ilgilenilen bileşiklere ait standartlar yardımıyla yabancı meyve türlerine göre uyarlanarak asetonitril ve saf su ile hazırlanan %1’lik formik asit ile gradient çözücü programında çalışılmıştır. HPLC-DAD için çalışma koşulları Çizelge 3.3.7.1.’de özet olarak verilmektedir.

Çizelge 3.3.7.1. HPLC-DAD için çalışma koşulları

Süre (dakika)	HPLC-DAD çalışma koşulları
0-10	%13 asetonitril, %87 %1 lik formik asit
10-20	%41,5 asetonitril,%58,5 %1 lik formik asit
20-25	%70 asetonitril, %30 %1 lik formik asit
25-35	%10 asetonitril, %90 %1 lik formik asit

3.3.8. Ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi (UV-VIS) ile toplam fenol tayini

Elde edilen ekstraktların toplam fenol tayinleri, bazik ortamda Folin Ciocalteu fenol reaktifi kullanılarak yapılmıştır (Güçlü ve ark. 2006, Sarıburun ve ark. 2010). 0,1 mol/L NaOH içinde %2 (w/v)’lik Na₂CO₃ içeren Lowry A çözeltisi ve %1’lik NaKC₄H₄O₆ içinde %0,5 CuSO₄ olacak şekilde Lowry B çözeltisi hazırlanır. Lowry A ve Lowry B 50:1 (v/v) oranında karıştırılarak Lowry C çözeltisi hazırlanır. Deney tüplerine x mL örnek/standart konur. Üzerine (2-x) mL saf su ve 2,5 mL Lowry C ilave edilerek karıştırılır, 10 dakika beklenir. Süre sonunda 1:3 oranında seyreltilmiş Folin reaktifinden 0,25 mL ilave edilerek karıştırılır, karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir. Bekleme süresi sonunda ekstraktların 750 nm dalga boyunda absorbansları okunarak gallik asit konsantrasyonuna göre grafiğe geçirilir. Ekstraktlar için toplam fenol miktarları kalibrasyon denklemi kullanılarak mg gallik asit/100 g örnek olarak hesaplanır. Toplam fenol miktarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği EK 5’de verilmiştir.

3.3.9. Ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi (UV-VIS) ile toplam flavonoid tayini

Meyvelerin spektrofotometrik toplam flavonoid tayinlerinde, Zhishen ve ark. (1999) tarafından geliştirilen metot yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu ve ark. 2002, Sarıburun ve ark. 2010). Çalışmada, meyvelerin flavonoid içeriği Zhishen ve ark.'nın (1999) uyguladığı kolorimetrik metot kullanılarak tayin edilmiştir. Meyve ekstraktlarından belirli hacimde alınarak 0,15 mL % 5 lik NaNO₂ çözeltisi ile karıştırılır. 6 dakika beklenir ve 0,15 mL %10 (w/v)'luk AlCl₃ ilave edilerek yeniden 6 dakika daha bekletilir. Süre sonunda deney tüpündeki çözeltiye 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklenir ve toplam hacim 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanır. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 510 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunur. Toplam flavonoid tayin çalışmalarında standart madde olarak kateşin kullanılır. Ekstraktlar için toplam flavonoid miktarları hesaplanan kalibrasyon denklemi kullanılarak mg (+) kateşin/ 100 g örnek olarak hesaplanmıştır. Toplam flavonoid miktarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği EK 5'de verilmiştir.

3.3.10. ABTS antioksidan kapasite metodu

Meyvelerden elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite tayininde ABTS metodu kullanılarak yapılmıştır (Güçlü ve ark. 2006, Sarıburun ve ark. 2010). ABTS metodunda 7 mM ABTS sulu çözeltisi 2,45 mM K₂S₂O₈ ile karıştırılarak karanlıkta 12-16 saat bekletilir. Süre sonunda elde edilen ABTS çözeltisi % 96'lık etanolle 1:10 oranında seyreltilir. 4 mL etanol ve 1 mL ABTS karıştırılarak 6. dakika sonunda 734 nm dalga boyunda kör örnek için absorbans değeri okunur (A_{kör}). Her bir ekstrakt yada fenol bileşiğinden belirli hacimde alınır, üzerine toplam hacim 4 mL olacak şekilde etanol eklenir ve 1 mL ABTS çözeltisi ilave edilerek karıştırılır, 6.dakika sonunda 734 nm de absorbans değeri okunur (A_{örnek}).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{kör} - A_{örnek}}{A_{kör}} \times 100 \quad (3.3.10-1)$$

Ölçümler sonucunda; hem ekstraktlar hem de fenolik bileşikler için Eşitlik 3.3.10-1 kullanılarak % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak ekstraktların toplam antioksidan kapasite değerleri “µmol troloks/ g örnek” şeklinde hesaplanmıştır. Antioksidan kapasite miktarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği EK 5'de verilmiştir.

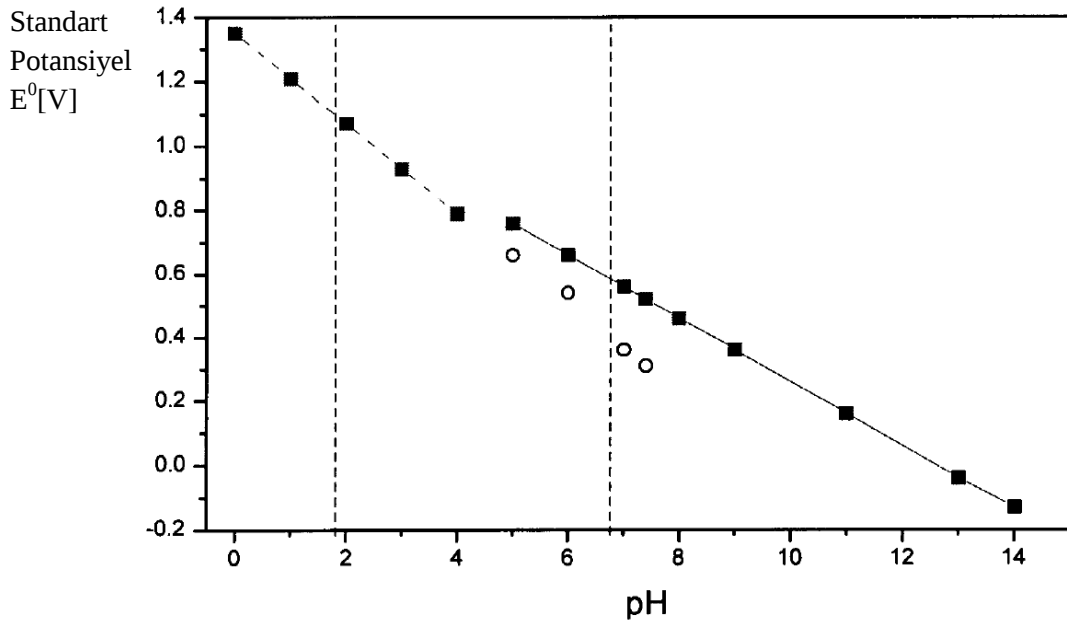
3.3.11. CUPRAC antioksidan kapasite metodu

Geliştirilen spektrofotometrik metod; çözeltinin, bir bakır(II) klorür çözeltisi, neokuproinin alkoldeki çözeltisi ve pH 7 amonyum asetat sulu tampon çözeltisi ile karıştırılması ve ardından oluşan Cu(I)-neokuproin kelatının absorbandsının 450 nm de okunmasını içerir (Apak ve ark. 2007). Deneysel çalışmada, 1 mL Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL neokuproin alkoldeki çözeltisi ve 1 mL amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltileri karıştırılır, üzerine belirli hacimde ekstrakt ilave edilir ve toplam hacim 4 mL olacak şekilde saf su ilave edilir. İşlemi takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan örneğe karşı 450 nm’de absorbands değerleri okunur. Ekstraktlar için antioksidan kapasite değeri hesaplanan kalibrasyon denklemi kullanılarak $\mu\text{mol trolox/g}$ örnek olarak hesaplanır. Antioksidan kapasite miktarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği EK 5’de verilmiştir.

3.3.12. Cr (VI) antioksidan kapasite (CHROMAC) metodunun geliştirilmesi

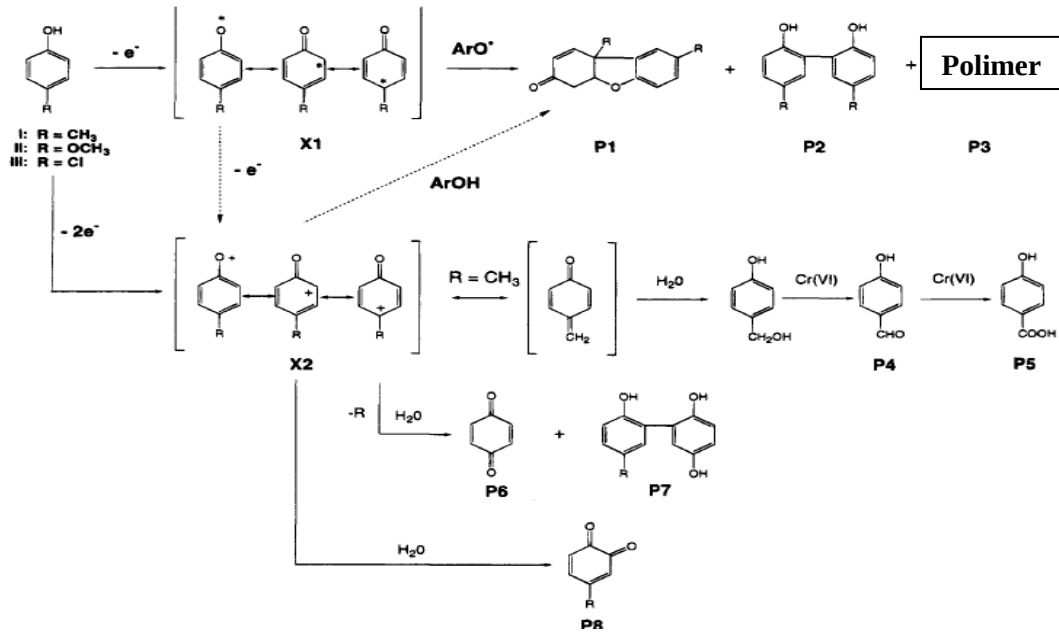
CHROMAC metodu; asidik ortamda aşırı miktarda bulunan Cr(VI)’nın organik maddeleri yükseltgemesi ve geriye kalan Cr(VI)’nın 1,5-difenilkarbazid ile gerçekleştirdiği kararlı diaquabis(1,5-difenilkarbazon)krom(III) kompleksi oluşturma özelliğine dayanmaktadır (Gündüz 1985). Oluşan kompleks 540 nm dalgaboyunda maksimum absorbands göstermektedir.

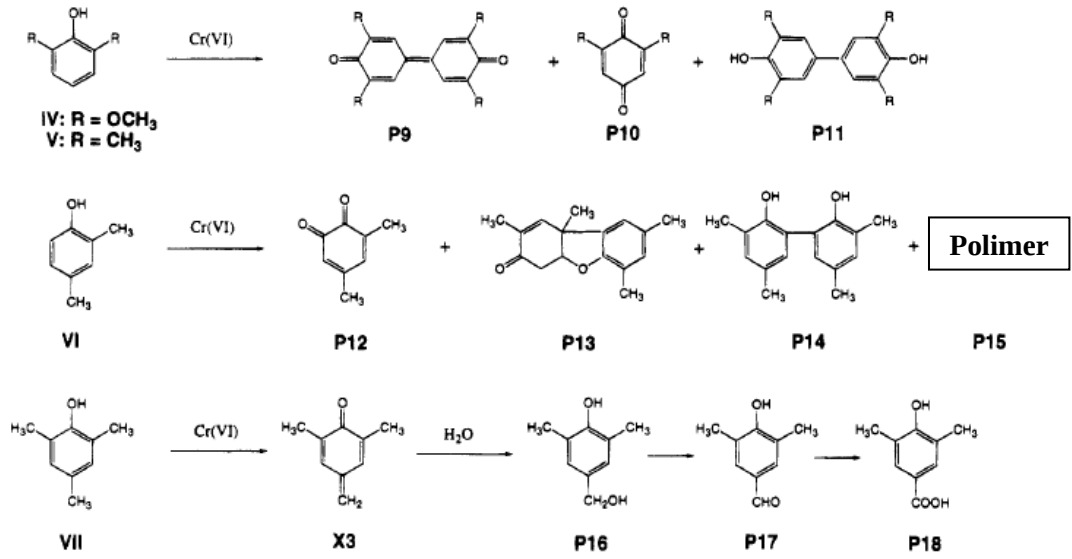
Potasyum dikromat çözeltileri bilinen en iyi yükseltgenlerdendir. Asidik ortamda yarı reaksiyonun standart potansiyeli +1,33 V olarak belirlenmiştir ($E^0=+1,33\text{ V}$). Literatüre bakıldığında Cr(VI)’nın farklı pH aralığında değişen indirgenme potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir (Kotas^Â ve Stasicka 2000). Şekil 3.3.12.1.’de Cr(VI) nın farklı pH değerlerinde değişen potansiyel değerleri gösterilmektedir.



Şekil 3.3.12.1 Cr(VI) nın farklı pH değerlerinde değişen potansiyel değerleri

Ayrıca, Cr(VI) nın substitue fenoller ile reaksiyonları incelenmiştir ve değişen pH'larda ortama farklı sayıda proton verildiği ve dolayısıyla reaksiyon kinetiği ve mekanizmalarının değiştiği bildirilmiştir (Elovitz ve Fish 1995). Şekil 3.3.12.2'de Cr(VI) nın substitue fenollerini oksidasyonunda mekanizması gösterilmektedir.





Şekil 3.3.12.2. Cr (VI) nın substitue fenolleri oksidasyonunda mekanizma (Elovitz ve Fish 1995).

Elovitz ve Fish (1995) tarafından yapılan çalışmada; Cr(VI) nın fenol/substitue fenol yapılarını fenoksil radikaline ya da katyonuna dönüştüğü belirtilmektedir. Ayrıca fenole bağlı substituentler oksijen ya da kükürt içeren gruba sahip olduğunda, Cr(VI)'nın bu gruplarla da yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları verebildiği belirtilmiştir.

Bu bilgiler dikkate alındığında CHROMAC metodunda uygun pH/E⁰ değerinin belirlenmesi ve belirlenen pH değerinde; reaksiyon ortamında oluşabilen diğer krom türlerinin 1,5-difenilkarbazid ve fenolik maddelerle ve reaksiyon sonucu oluşan 1,5-difenilkarbazon bileşiğinin diğer krom türleriyle, reaksiyona girip girmediğinin belirlenmesi gereklidir. Belirtilen sebepler nedeniyle CHROMAC için planlanan deneysel çalışmalarda; uygun pH/E⁰ değerinin, Cr(VI)'nın 1,5-difenilkarbazid ile girdiği reaksiyondaki mol oranının, reaksiyon süresinin, oluşan kompleks için süreye bağlı absorban değişiminin ve fenolik maddeler için doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda ABTS, CUPRAC ve diğer mevcut olan antioksidan kapasite tayin metotlarına alternatif olarak geliştirilen CHROMAC metodu için incelenmesi gereken parametreler, literatürden de yararlanılarak planlanmıştır. Özellikle Cr(VI) kullanılması sebebiyle yükseltgenme indirgenme potansiyelinin fenolik yapılar için farklı pH aralıklarında uygun olabileceği görülmüştür (Kotas^Â ve Stasicka 2000). Bu amaçla pH

ye bağlı yükseltgenme indirgenme potansiyel değişimi, difenilkarbazid ile kompleks oluşumuna ait mol oranı belirlenmesi, reaksiyon süresinin uygunluğu, doğrusal çalışma aralığı yanında gerçek örneklerle uygulanabilirliği ve gerçek örneklerde karşılaşılacak glisin, sitrik asit, glikoz ve benzeri girişim etkileri ve reaksiyon mekanizmasının değerlendirilmesi amacıyla metodun en uygun koşullarının (optimizasyon) belirlenmesi hedeflenmiş olup, elde edilen sonuçlar analitik parametrelere göre değerlendirilmiştir. CHROMAC metodunun yeni bir antioksidan kapasite tayin metodu olarak kullanılabilir olduğu yapılan çalışmalar sonucunda literatüre kazandırılmıştır.

4. BULGULAR

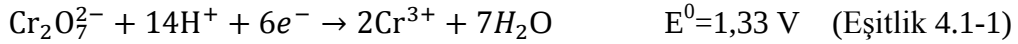
Bursa’da doğal yetişen *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., türü yabancı meyvelerdeki fenolik maddelerin kantitatif tayinlerine uygun örnek hazırlama ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanılarak tayin yöntemi geliştirilmiştir.

4.1. CHROMAC metodunun optimizasyon sonuçları

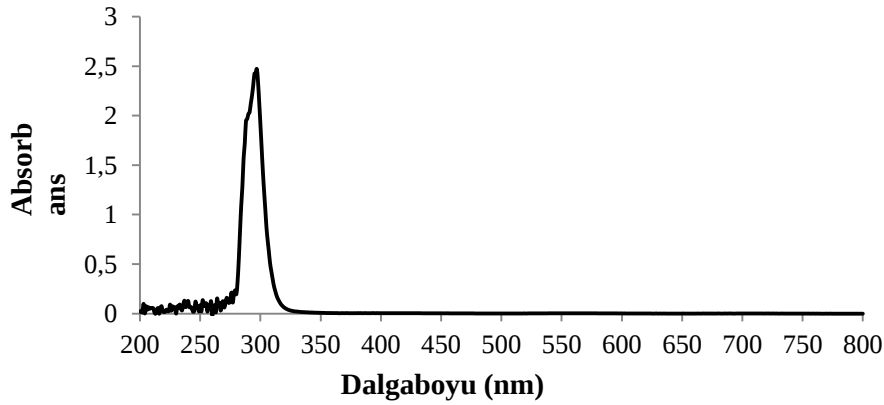
pH/E⁰ değerinin belirlenmesi

Cr(VI) çözültüsü bilinen en iyi yükseltgenlerden biridir ve oldukça karardır. Asidik ortamda (pH=1-1,5) yarı reaksiyonun standart potansiyeli 1,33 V ($E^0=1,33$ V). Birçok antioksidan maddenin yükseltgenme-indirgenme potansiyeli 0,2-0,8V arasında değişmektedir. Literatüre bakıldığında Cr(VI)’nın farklı pH aralığında değişen indirgenme potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir (Kotas^Â ve Stasicka 2000). Cr (VI), fenol yapısını önerilen yapılara yükseltgediğinde Cr(VI) da Cr(III), Cr(IV) ya da Cr(V) yapılarına indirgenebilmektedir (Kotas^Â ve Stasicka 2000). Ancak asidik ortamda (pH<3) Cr(IV) ve Cr(V) in kararlı olmadığı, Cr(III)’ün ise bu ortamda fenolik madde ya da 1,5-difenilkarbazid ile reaksiyon vermediği literatürde belirtilmektedir (Pflaumnd ve Howick 1956, Elovitz ve Fish 1995). Ancak pH 3-4 olduğunda Cr(III)’ün fenolik madde (kafeik asit) ile reaksiyon verdiği, Cr(III) ile 1,5-difenilkarbazon arasında kompleks oluştuğu ve 550 nm de maksimum absorbans verdiği dolayısıyla bu pH değerinin önerdiğimiz antioksidan kapasite metodu için uygun olmadığı da literatürde gösterilmiştir (Thoma ve ark. 2008). Bu nedenle CHROMAC metodu için uygun pH değeri pH= 2,8 olarak seçilmiştir. Şekil 4.1.1’de CHROMAC çalışma şartlarında Cr(III), 1,5-difenilkarbazid ve askorbik asit varlığındaki spektrumu gösterilmiştir. Önerilen antioksidan kapasite tayin metodunun doğal ürünlerde bulunan fenolik maddelerin antioksidan özelliğinin belirlenmesi için çalışılan pH değerinde ortamın indirgenme potansiyelinin bu maddeler için seçici olması dikkate alınmıştır. Reaksiyon ortamında fosfat tamponu kullanılmıştır. CHROMAC metodunda, pH 2,8 olarak ayarlandığında fenolik maddelerin tayini için uygun ortam sağlanmaktadır. pH=2,8 tampon çözültü ortamında çalışıldığında Cr(VI)’nın indirgenme potansiyeli 0,95 V dur (Elovitz ve Fish 1995).

Yarı pil reaksiyonları için standart indirgenme potansiyeli ve yarı pil reaksiyonu Eşitlik 4.1-1’de gösterilmiştir. pH=2,8 tampon çözelti ortamında çalışıldığında Cr(VI)’nın indirgenme potansiyeli Nernst eşitliği dikkate alınarak hesaplanmıştır (Eşitlik 4.1-2). Değişen pH değerleri için Cr(VI)’nın indirgenme potansiyeli Nernst Eşitliği dikkate alınarak Ek 2’ de hesaplanmıştır.

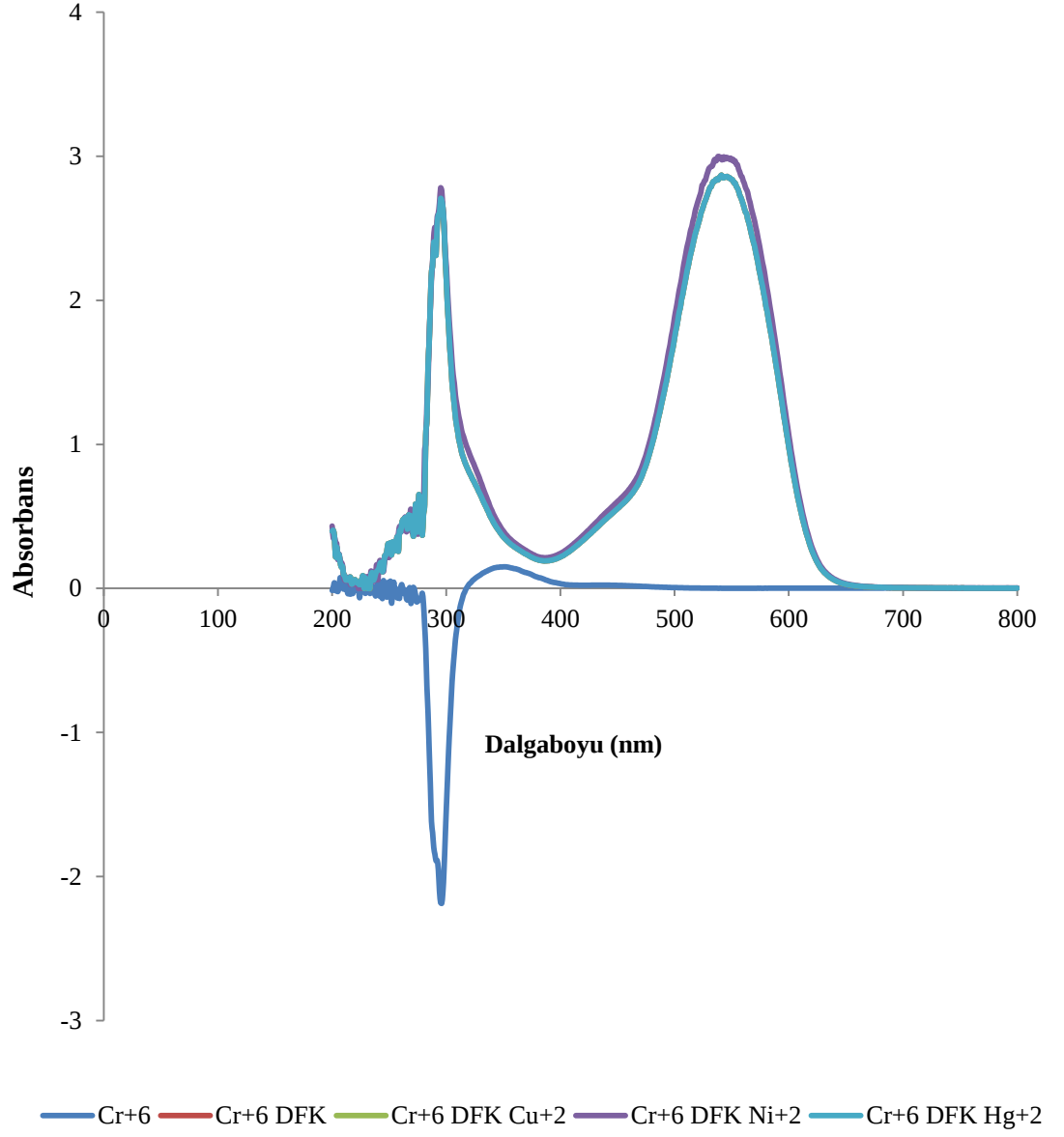


$$E_{\text{Hücre}}=E^0 - \frac{0,05916}{6} \log \frac{[\text{Cr}^{+3}]^2}{[(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{-2}][\text{H}^+]^{14}} \quad (\text{Eşitlik 4.1-2})$$



Şekil 4.1.1. Cr (III) ile askorbik asit arasındaki elektronik absorbpsiyon spektrumu

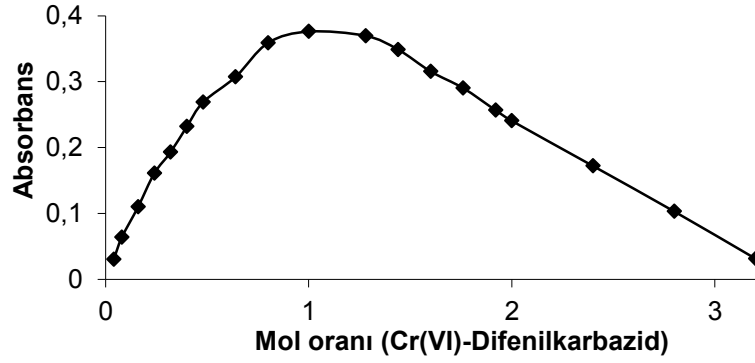
Ayrıca ortamda bakır, nikel ve civa gibi metallerin bulunması durumunda reaksiyon ortamında bulunan difenilkarbazid yada difenikarbazon ile mor renkli kompleksler oluştuğu belirtilmektedir (Balt ve Dalen 1963, Salinas-Herna’ndez ve ark. 2003). CHROMAC metodu ile antioksidan kapasite tayini yapılmak istendiğinde çalışılan ortamın pH değeri önem kazanmaktadır. Literatürde belirtilen çalışmalar CHROMAC metodu ile uygun pH ortamını sağlamamaktadır. Literatürde Cu, Ni, ve Hg komplekslerinin pH 2,8’de oluştuğu yazmamaktadır. Şekil 4.1.2’ de CHROMAC deneysel ortamında Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Hg^{+2} (5×10^{-5} mol/L) varlığında girişim etkisi incelenmiştir. Şekil 4.1.2’ de CHROMAC deneysel ortamında Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Hg^{+2} varlığında girişim etkisi incelenmiştir. Dolayısıyla ortamda metallerin bulunması CHROMAC metodu için girişim etkisi yaratmamaktadır.



Şekil 4.1.2. Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Hg^{+2} varlığında girişim etkisinin incelenmesi

Mol oranı belirlenmesi

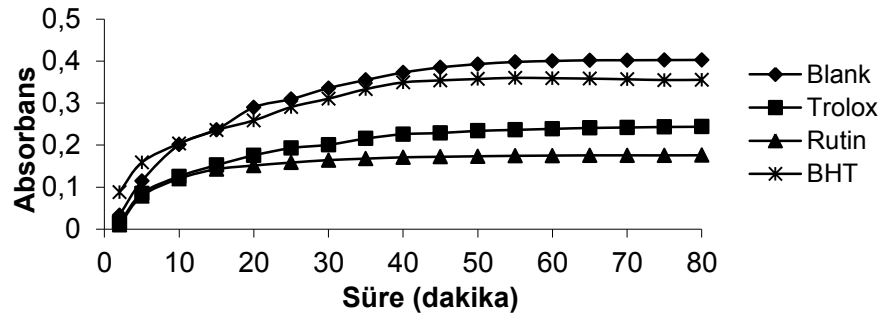
Cr(VI):Difenilkarbazid arasındaki mol oranı Jobs metoduna göre belirlenmiştir. Deneysel ortama, sabit mol oranında difenilkarbazid değişen mol oranında ise Cr(VI) eklenmiştir. Süre sonunda oluşan diaquabis(1,5-difenilkarbazon)krom(III) kompleksinin 540 nm dalgaboyunda absorbands değeri ölçülmüştür. Şekil 4.1.3.'de Cr(VI):Difenilkarbazid kompleksinde metal ligand oranının belirlenmesi amacıyla elde edilen mol oranına karşı absorbands grafiği görülmektedir.



Şekil 4.1.3. pH=2,8 ortamında Cr(VI):Difenilkarbazid için mol oranının belirlenmesi

Reaksiyon süresinin belirlenmesi

Kör örnek, bilinen ve aynı derişimde Troloks, Butillenmiş hidroksi toluen ve Rutin çözeltileri hazırlanarak CHROMAC metodu uygulanmış ve reaksiyon süresi absorbands değişimi dikkate alınarak 50 dakika olarak belirlenmiştir. Şekil 4.1.4'de CHROMAC metodu için reaksiyon süresinin belirlenmesi gösterilmiştir.



Şekil 4.1.4. Reaksiyon süresine bağlı olarak Cr(VI)-Difenilkarbazid kompleksinin absorbands değişimi

Doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi

Fenolik maddeler için derişim aralıkları, doğru denklemleri ve troloks eşdeğerinde antioksidan kapasite değerleri Çizelge 4.1.1 de verilmiştir. Doğru denklemleri doğrusal aralık içerisinde beş noktali olarak derişime karşılık absorbans verilerine göre çizdirilmiştir ve $6,0 \times 10^{-5}$ ile $4,5 \times 10^{-4}$ mol/L aralığındadır. R^2 değerleri 0,9901 üzerindedir. Elde edilen sonuçlar; CHROMAC metodunun fenolik asitler, flavonoidler ve sentetik antioksidanlar için duyarlı olduğunu göstermiştir. Fenolik asitler, flavonoidler, malvidin, askorbik asit ve BHT için antioksidan kapasite değerleri TEAC eşdeğerinde Çizelge 4.1.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1.2’de fenolik maddeler için literatürde belirtilen ve CHROMAC metoduyla tayin edilen TEAC değerlerinin karşılaştırılmıştır. Literatürde flavonoidlerin fenolik asitlerden daha yüksek TEAC değerine sahip olduğu belirtilmektedir (Heim ve ark. 2002). Gallik asit, ellagik asit, kuersetin ve (+)-kateşin hariç diğer fenolik maddeler literatürde CUPRAC ve ABTS ile tayin edilen TEAC değerlerine uygunluk göstermektedir (Apak ve ark. 2008, Yıldız ve ark. 2008). Bu fenolik maddeler için tayin edilen değerler CUPRAC ve ABTS ile tayin edilen TEAC değerlerinden daha düşüktür. CHROMAC metodunda deneysel sonuçlardan asidik ortamda gallik asit ve kuersetinin Cr(VI) ile daha fazla okside olduğu sonucuna varılabilir. Flavonoidler içerisinde kuersetin en yüksek TEAC değerine sahiptir. Rutin; kimyasal yapısında 3 pozisyonunda –OH yerine o-rutinase yapısına sahip olduğundan daha düşük TEAC değerine sahiptir. Kuersetinin göreceli olarak daha yüksek TEAC değerine sahip olması aynı zamanda rutin’in kuersetin glikoziti olması ve asidik ortamda aglikonuna dönüşmesi ile de açıklanabilir. Hidroksisinamik asitler için tayin edilen TEAC ve ABTS değerleri uyum göstermektedir (Apak ve ark. 2008). Sırasıyla TEAC (ABTS) değerleri; p-kumarik asit 2,28 (2,22); ferulik asit 2,20 (2,20); klorojenik asit 2,15 (1,20); ellagik asit 1,90 (1,21); gallik asit 1,70 (3,00) ve kafeik asit 1,55 (1,40) gözlenmiştir. p-kumarik asit ve ferulik asit bir fenolik –OH grubuna sahip olmalarına rağmen iki -OH grubu taşıyan klorojenik asit ve kafeik aside göre daha yüksek TEAC değerine sahiptir. Bu durum gallik asit, ellagik asit ve rosmarinik asit gibi moleküllerde olan OH gruplarının sterik etkisi ve konjugasyonu ile açıklanabilmektedir. Küçük moleküllerde durum daha kolaydır ve yüksek TEAC katsayıları elde edilir.

Çizelge 4.1.1 Fenolik maddeler için doğrusal çalışma aralığı, R² ve TEAC değerleri

Fenolik maddeler	Doğrusal aralık (mol/L)	Doğru Denklemi	R ²	TEAC değerleri
Gallik asit	1,2×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 253,18x +0,0596	0,9989	1,70
Troloks	3,0×10 ⁻⁴ -7,0×10 ⁻⁴	y = 566,38x – 0,1369	0,9994	1,00
Kafeik asit	3,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 593,86x – 0,1125	0,9997	1,55
Ferulik asit	2,5×10 ⁻⁴ -4,0×10 ⁻⁴	y = 361,8x – 0,0681	0,9901	2,20
Ellagik asit	3,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 419,57x – 0,0686	0,9908	1,90
Klorojenik asit	2,5×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 412x – 0,0999	0,9933	2,15
Rosmarinik asit	2,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 220,71x +0,0779	0,9921	1,71
Protokatekuik asit	6,0×10 ⁻⁵ -1,0×10 ⁻⁴	y = 337,5x + 0,096	0,9995	0,97
Vanillik asit	3,0×10 ⁻⁴ -4,0×10 ⁻⁴	y = 721x – 0,1529	0,9976	1,44
2-hidroksisinamik asit	3,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 442,86x – 0,0806	0,9999	1,88
p-hidroksibenzoikasit	3,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 433,4x – 0,0937	0,9911	2,00
p-kumarik asit	2,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 247,32x+0,0129	0,9975	2,28
Trans-sinamik asit	3,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 440x – 0,0631	0,9990	1,77
Rutin	3,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 369x – 0,0815	0,9989	2,26
Kuersetin	3,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 312,14x – 0,0661	0,9999	2,53
(+)-kateşin	3,5×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 422x – 0,1418	0,9999	2,38
Malvidin	3,0×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻⁴	y = 486,71x – 0,1217	0,9968	1,95
Askorbik asit	8,3×10 ⁻⁵ -1,3×10 ⁻⁴	y = 23,6x + 0,1460	0,9936	2,72
BHT	1,2×10 ⁻⁴ -4,0×10 ⁻⁴	y = 350,5x + 0,0381	0,9982	1,40

Çizelge 4.1.2. Fenolik maddeler için TEAC değerlerinin karşılaştırılması

Fenolik maddeler	TEAC (CHROMAC)	TEAC (ABTS)	TEAC (FRAP)	TEAC (CUPRAC)
Apigenin	0,45	0,65	-	0,82
Luteolin	1,43	1,01	-	2,90
Kamferol	1,21	0,90	0,98	1,47
Kuersetin	2,53	2,77	2,92	4,38
Mirisetin	2,38	3,43	-	4,27
Genistein	0,81	-	-	-
Hesperetin	0,77	1,01	-	0,85
Naringenin	0,79	0,64	0,22	2,28
Rutin	2,26	2,40	2,20	2,56
Naringin	0,74	0,62	-	0,13
Hesperidin	0,75	1,05	-	0,79
p-hidroksibenzoik asit	2,00	-	-	-
Vanilik asit	1,44	1,25	-	1,32
Protokatekuik asit	0,97	-	-	-
Sirincik asit	1,85	1,50	-	1,67
Ferulik asit	2,20	2,16	1,12	1,34
p-kumarik asit	2,28	2,20	-	1,15
Kafeik asit	1,55	1,39	1,84	2,87
Klorojenik asit	2,15	1,21	1,61	2,47
Rosmarinik asit	1,71	2,30	-	5,65

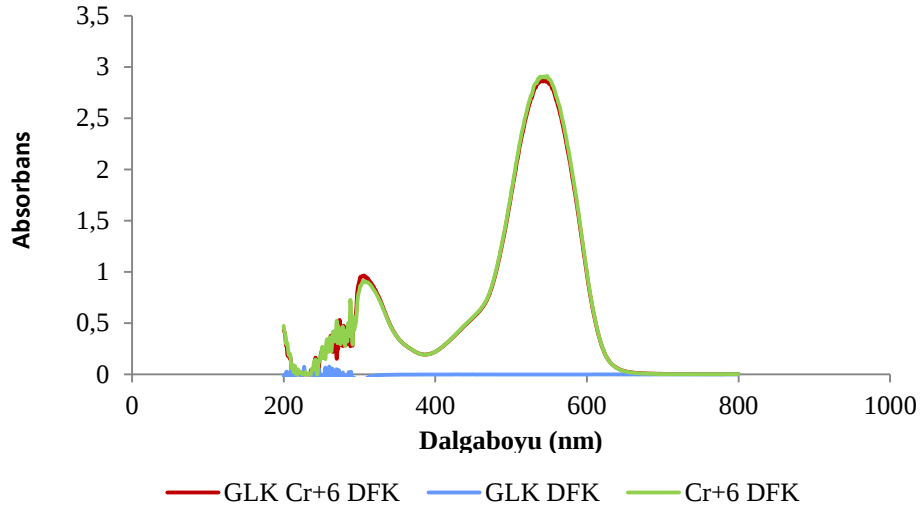
4.2. CHROMAC metodunun gerçek örneklerle uygulanabilirliği

Geliştirilen indirekt (dolaylı) spektrofotometrik antioksidan kapasite metodu pH 2,8 ortamında fenolik maddelerle Cr(VI) arasında gerçekleşen reaksiyona dayanmaktadır. Reaksiyon sonrası geriye kalan Cr(VI) ile 1,5-difenilkarbazid arasında oluşan diaquabis(1,5-difenilkarbazon)krom(III) kompleksinin 540 nm absorbans ölçümü yapılır (Işık ve ark. 2013). Cr(VI)'nın standart redoks potansiyeli oldukça yüksektir ve dolayısıyla bitki ve meyvelerde bulunan glikoz, sitrik asit gibi maddeleri de yükseltgeyerek ölçümlerde pozitif hataya sebep olabilmektedir. Bu nedenle, çözeltinin asitliği ayarlanarak, Cr(VI)'nın yükseltgeme gücü sabit tutulur. Böylece seçicilik artar ve antioksidan maddelerin yükseltgenmesi sırasında oluşan krom türlerinin girişim etkileri ortadan kalkar. Ayrıca Cr(III) ile fenolik madde arasındaki reaksiyonun absorbans dalgaboyu Cr(III) ile difenilkarbazon kompleksinin dalgaboyuyla değişmemelidir. pH 3-4 aralığında olduğunda fenolik bileşikler ile Cr(III) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan ürün 550 nm de maksimum absorbans vermektedir (Thoma ve ark. 2008). Dolayısıyla pH değerini 2,8'e de düşürmekle Cr(III) ile fenolik maddeler arasındaki reaksiyon oluşumu giderilmiş olur ve absorbans 540 nm'de ölçülmüştür. Basit şekerler, sitrik asit ve amino asitler gerçek antioksidan maddeler değildir ancak

organik yapılarından dolayı belirli bir antioksidan kapasite değerine sahiptir. 0,1 ve 0,15 mM glisin, sitrik asit ve glikoz için CHROMAC metodu ile yaklaşık 0,30 mM troloks eşdeğerinde antioksidan kapasite değeri belirlenmiştir. 0,3 mM troloks için belirlenen antioksidan kapasite ise troloks eşdeğerinde 0,70 mM dır (Çizelge 4.2.1). Glisin, sitrik asit ve glikozun CHROMAC metoduna girişim etkisini incelemek için içerisinde 0,3 mM Troloks bulunan deney tüpüne glisin, sitrik asit ve glikoz maddelerinden ayrı ayrı 0,1 ve 0,15 mM eklendi. CHROMAC metodu uygulanarak antioksidan kapasite değerleri ölçülmüştür (Çizelge 4.2.1) ve yaklaşık 0,70 mM troloks olarak sabit bir değer bulunmuştur. Ayrıca Şekil 4.2.1’de girişim etkisi çözelti ortamına glikoz ilave edilerek incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Cr(VI)’nın uygun derişimde olduğunu ve standart potansiyelleri 0,2-0,6 V olan bu maddelerin asidik ortamda girişim etkisi oluşturmadığını göstermiştir.

Çizelge 4.2.1. Glisin, sitrik asit ve glikoz içeriğinde CHROMAC yöntemiyle tayin edilen antioksidan kapasite değerleri

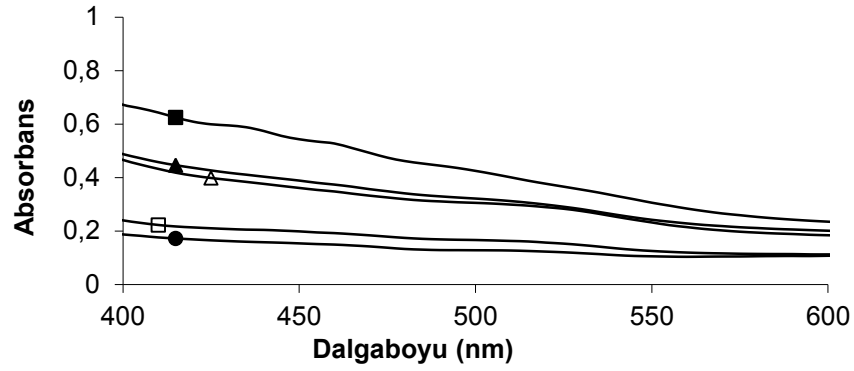
Maddeler	Antioksidan kapasite (mM Troloks)
Troloks	0,70
0,1 mM glisin	0,30
0,15 mM glisin	0,31
Troloks+0,1 mM glisin	0,70
Troloks+0,15 mM glisin	0,70
0,1 mM sitrik asit	0,37
0,15 mM sitrik asit	0,39
Troloks+0,1 mM sitrik asit	0,70
Troloks+0,15 mM sitrik asit	0,69
0,1 mM glikoz	0,25
0,15 mM glikoz	0,26
Troloks+0,1 mM glikoz	0,69
Troloks+0,15 mM glikoz	0,69



Şekil 4.2.1. Girişim etkisinin incelenmesi

CHROMAC metodu ile antosiyaninlerin girişim etkisinin incelenmesi

Antosiyaninler, meyveler ve diğer bitki gruplarında bulunan fenolik maddeler içerisinde önemli bir grubu oluşturmaktadırlar ve 540 nm’de maksimum absorbans vermektedirler (Annika Nyman ve Jorma T. Kumpulainen 2001). Antosiyaninler pH değerine bağlı olarak farklı türlerde bulunabilirler. Ortamın pH değeri 1 olduğunda flavilyum katyonu baskındır ve pembe, kırmızı renk gösterir. Ayrıca pH değeri 2-4 aralığında ise kuinoidal mavi türler baskındır. CHROMAC metodunda antioksidan etkisinin incelenmesi için pH 2,8 ortamında pelargonidin standart maddesi ve *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* meyvesinin ayrı ayrı spektrumları alınmıştır. pH 2,8 ortamında pelargonidin standart maddesi için maksimum absorbans 550 nm olarak belirlenmesine rağmen *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* meyvesi 540 nm’de absorbans göstermemiştir. Bu sonuçlar antosiyaninlerin pH 2,8 ortamında CHROMAC metodu ile antioksidan kapasite tayinlerinde girişim etkisi yapmadığını göstermektedir. Şekil 4.2.2.’de *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* meyvesi için pH 2,8 ortamında farklı çözücülerde absorbans spektrumları gösterilmiştir. Cr(VI) ortamda bulunan fenolik maddelerin dışında diğer organik maddeleri (metanol/etanol) de yükseltgeyebileceği için çözücü girişim etkileri dikkate alınmıştır. Bu amaçla standart maddelerin doğrusal aralığı yada materyalin antioksidan kapasitesi belirlenirken kullanılan çözücü ile blank ölçüm alınır ve bu girişim etkisi ortadan kaldırılmış olur.



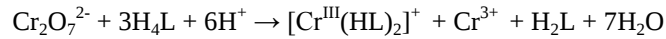
-●- Su
-Δ- Metanol
-□- Su/Etanol (%50/50)
-▲- Su/Metanol (%50/50)
-■- Etanol

Şekil 4.2.2. *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* meyvesi için pH 2,8 ortamında farklı çözücülerde absorbans spektrumları

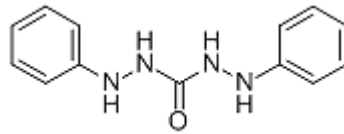
4.3. CHROMAC metodu ve reaksiyon mekanizması

Bu çalışmada; Cr(VI)'nın asidik ortamda organik maddeleri yükseltgemi ve 1,5-difenilkarbazid ile kararlı diaquabis(1,5-difenilkarbazon) krom(III) kompleksi oluşturma özelliğinden yararlanılmıştır (Gündüz 1985). Bu amaçla geliştirilen metotta, organik madde üzerine aşırı Cr(VI) çözeltisi (pH=2,8 tampon ortamında) eklendikten sonra geriye kalan (organik madde ile yükseltgenme-indirgenme tepkimesi vermeyen) Cr(VI) çözeltisinin 1,5-difenilkarbazid ile oluşturduğu kompleksin 540 nm absorbansı okunur.

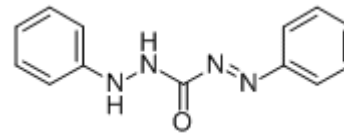
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + \text{H}^+ + n - \text{elektron indirgenme(fenolik maddeler)} \rightarrow \text{Cr}^{3+} + n - \text{elektron yükseltgenme ürünü (aşırı)}$



H_4L
Difenilkarbazid



H_2L
Difenilkarbazon



Şekil 4.3.1. CHROMAC metodu ve reaksiyon mekanizması

Kompleksin absorbans değeri Cr(VI) konsantrasyonu ile ilişkilidir. Buna göre hazırlanan kör örneğin absorbans (aşırı Cr(VI) çözeltisinin 1,5-difenilkarbazid ile

oluşturduğu kompleksin absorbanansı) değerinden örnek için okunan absorbanans değeri matematiksel olarak çıkartılır. Bu absorbanans farkından örneğin antioksidan kapasite değeri belirlenir (Işık ve ark. 2013).

$$A_{\text{Örnek}} = A_{\text{Blank}} - A_{\text{Geriye kalan}} \quad (4.3. -1)$$

Burada A_{Blank} kör örneğin absorbanansıdır (aşırı Cr(VI) çözeltisinin 1,5-difenilkarbazid ile oluşturduğu kompleksin absorbanansı). $A_{\text{örnek}}$ ise örnek için okunan absorbanans değeridir.

Yabani meyvelerden elde edilen farklı polaritelerde hazırlanan fenol ekstraktlarının antioksidan kapasite tayini CHROMAC metodu uygulanarak belirlenmiştir. Deneysel çalışmada, deney tüpüne 2 ml fosfat tampon çözeltisi (pH 2,6), 100 mg/L $K_2Cr_2O_7$ çözeltisinden 0,25 mL ve bilinen hacimde ekstrakt eklenir. Yaklaşık 1 dk sonra 0,5 mL 1,5-difenilkarbazid ($3,4 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) eklenir ve toplam hacim 5 mL'ye saf su ile tamamlanır. 50 dakika karanlıkta bekletilir ve süre sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan örneğe karşı 540 nm'de absorbanans değerleri okunur. CHROMAC metodunda standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Her bir ekstaktın/standartın 540 nm dalga boyunda absorbanans değeri okunarak troloks miktarına göre grafiğe geçirilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak ekstraktların toplam antioksidan aktivite değerleri $\mu\text{mol troloks/g örnek}$ şeklinde hesaplanmıştır. Antioksidan kapasite miktarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği EK 5'de verilmiştir.

4.4. CHROMAC metodunun gerçek örneklerle istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Sorbus torminalis L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., türlerinin meyveleri için, ABTS, CUPRAC ve CHROMAC metotları ile tayin edilen antioksidan kapasite değerleri arasındaki ilişki t testi uygulanarak ve korelasyon değerleri belirlenerek değerlendirilmiştir. Korelasyon ve t-testi hesaplanmasında Microsoft Office 2010 Excel programı kullanılmıştır. T-testi, iki değişik grup sayısal veri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek, ya da gözlenen ortalama değer varsayılan ya da öngörülen (ya da önceki araştırmalarda elde edilen) değerden farklı olup olmadığını tespit etmek için kullanılır. Sonuçlar arasında anlamlı fark olup olmadığı tablo değerlerinin karşılaştırılmasıyla anlaşılabilir. $p < 0,05$ ise %95 güvenle sonuçlar

arasında anlamlı bir fark vardır, $p>0,05$ ise sonuçla arasında anlamlı bir fark yoktur diyebiliriz.

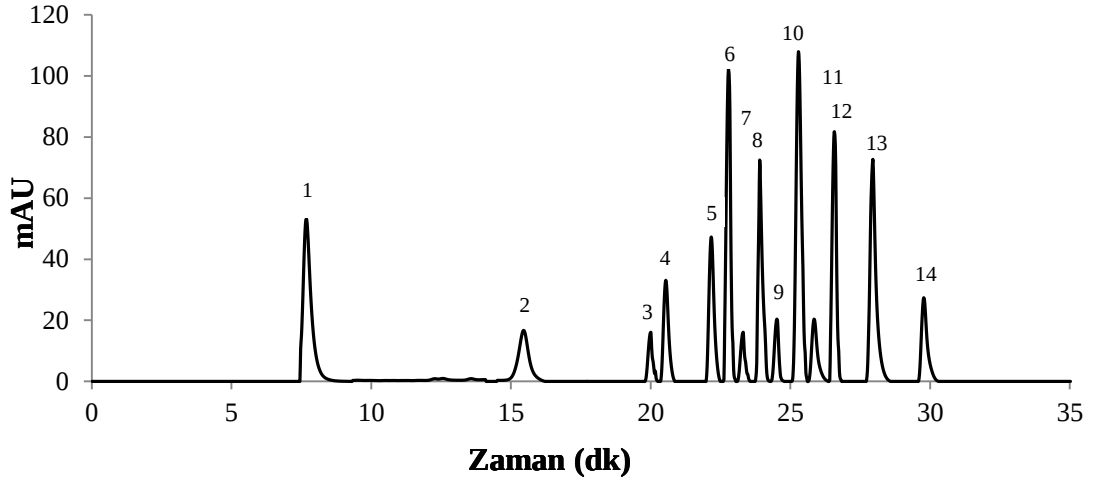
4.5. HPLC-DAD Sonuçları

4.5.1. Standart fenolik bileşiklerin HPLC-DAD sonuçları

Standart fenolik maddeler 20 mg/L derişiminde olacak şekilde metanolde çözüldü ve Bölüm 3.2.3 de belirtilen çalışma koşullarında HPLC-DAD ile analizi yapıldı. Her bir standart maddenin HPLC-DAD kromatogramları alındı. Bu standart fenolik maddeler için konsantrasyona karşılık pik alan değerleri ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (Çizelge 4.5.1.1). Şekil 4.5.1.1’de fenolik maddelerin HPLC-DAD kromatogramları verilmiştir.

Çizelge 4.5.1.1. Standart fenolik maddeler için HPLC-DAD kalibrasyon grafikleri

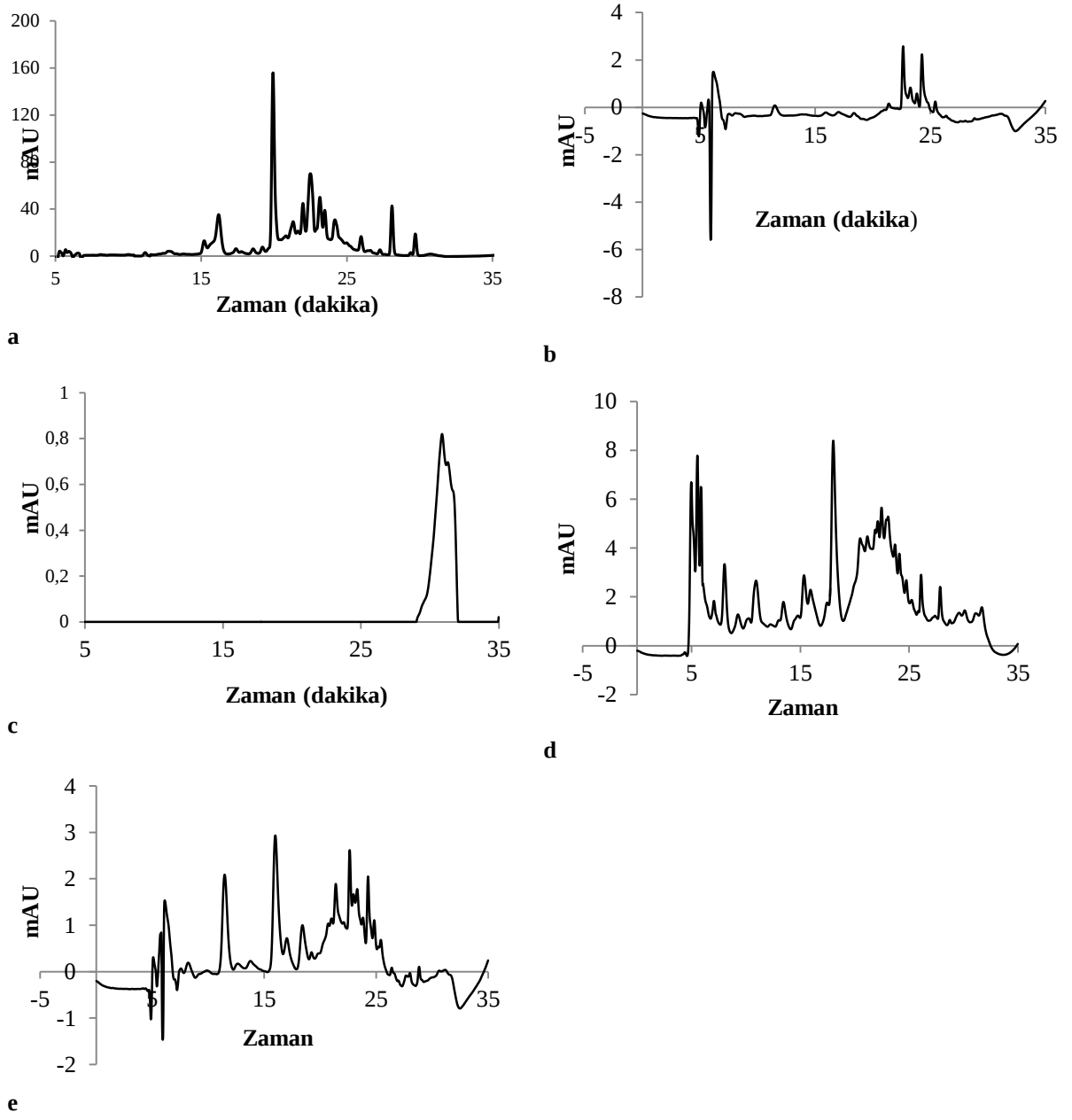
Standart Madde	Kalibrasyon grafiğı	Regresyon katsayısı
Gallik asit	$y = 38,777x - 0,9284$	0,9991
Klorojenik asit	$y = 45,653x - 12,353$	0,9984
Ellagik asit	$y = 22,125x - 6,4799$	0,9999
Kafeik asit	$y = 75,122x + 33,987$	0,9978
Ferulik asit	$y = 149,22x - 49,8500$	0,9998
<i>para</i> -Kumarik asit	$y = 202,43x - 49,4280$	0,9997
2-Hidroksisinamik asit	$y = 33,992x - 29,5330$	0,9999
Rosmarinik asit	$y = 44,987x + 14,798$	0,9992
Mirisetin	$y = 58,269x - 5,0429$	0,9993
Kuersetin	$y = 97,953x + 6,7125$	0,9997
Kamferol	$y = 81,245x + 16,435$	0,9996
Rutin	$y = 31,265x - 7,7728$	0,9999
Isokuersitrin	$y = 38,349x - 120,39$	0,9941
Kamferol glikozit	$y = 38,836x + 5,4211$	0,9984
Siyanidin	$y = 88,636x - 14,498$	0,9970
Delfinidin	$y = 89,461x - 92,956$	0,9954
Siyanidin glikozit	$y = 33,248x - 36,4330$	0,9960
Siyanidin rutinosit	$y = 14,683x - 4,4771$	0,9980



Şekil 4.5.1.1 Standart 20 mg/L fenolik maddelere ait HPLC kromatogramı (1; gallik asit, 2; klorojenik asit, 3; kafeik asit, 4; ellagik asit, 5; rutin, 6; isokuersitrin, 7; p-kumarik asit, 8; kamferol glikozit, 9; ferulik asit, 10; rosmarinik asit, mirisetin, 12; 2-hidroksisinamik asit, 13; kuersetin, 14; kamferol).

4.5.2. HPLC-DAD analizlerinde ekstraksiyon ve hidroliz metotlarının değerlendirilmesi

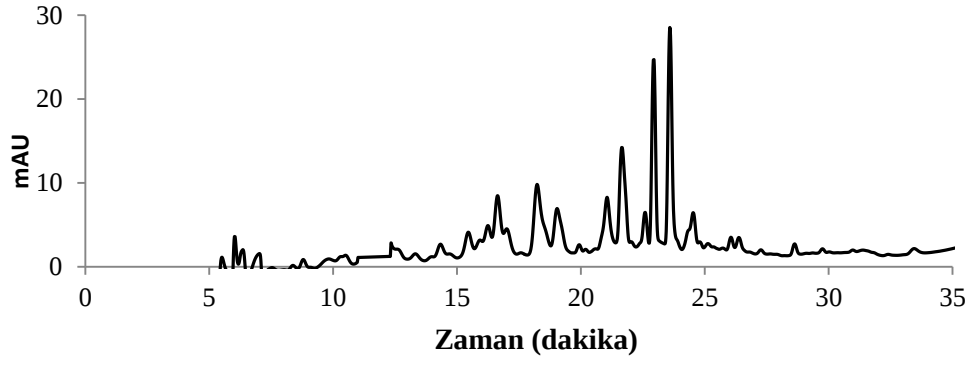
Yabani meyve türlerinin fenolik maddelerinin HPLC-DAD ile kalitatif ve kantitatif tayinlerinde ekstraksiyon ve hidroliz metotlarının geliştirilmesinde asidik, bazik, asidik-bazik ve enzimatik hidroliz teknikleri uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bazik, asidik-bazik ve enzimatik hidroliz teknikleri ile verimli sonuçlar elde edilemediği hidroliz tekniği olarak asidik hidroliz sonuçlarının daha verimli olduğu görülmüştür. Şekil 4.5.2.1a-4.5.2.1.e’de hidroliz ekstraktlarına ait HPLC kromatogramları görülmektedir.



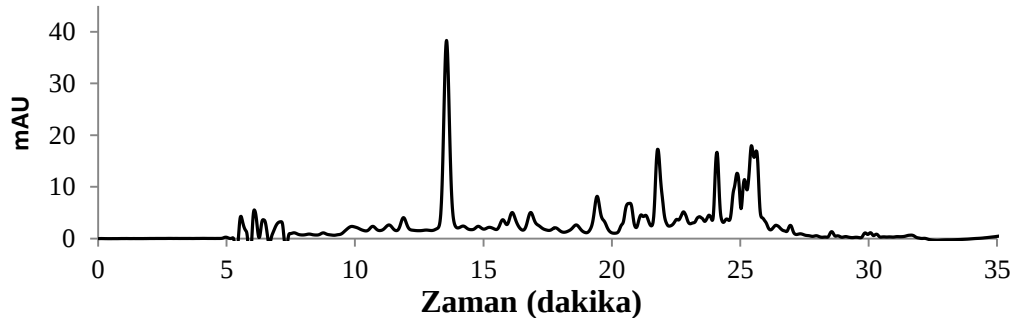
Şekil 4.5.2.1. *Prunus spinosa* L. *a*; asidik, *b*; bazik, *c*; asidik-bazik, *d*; sulu çözelti ortamında enzimatik, *e*; pH 5 tampon ortamında enzimatik hidroliz ekstraktına ait HPLC kromatogramı

4.5.3. *Sorbus* L. türlerinde bulunan fenolik maddeler

Sorbus domestica L. ve *Sorbus torminalis* L. türlerinde bulunan fenolik maddelerin HPLC kromatogramları Şekil 4.5.3.1’ de verilmektedir. *Sorbus domestica* L. ve *Sorbus torminalis* L. türlerinde bulunan fenolik maddelerin miktarları Çizelge 4.5.3.1’ de bulunmaktadır.



a



b

Şekil 4.5.3.1. *Sorbus* L. türlerinin metanol-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı. *a*; *Sorbus domestica* L., *b*; *Sorbus torminalis* L.

Çizelge 4.5.3.1. Ekstraksiyon metodu kullanılarak *Sorbus domestica* L. türünde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/ kg örnek)

Çözücüler	KLA	RA	EA	KA	FA	PKA	RUTİN	KUER	2-HD
Ultrasonik Ekstraksiyon	Su	4,15±0,10	4,15±0,33	3,04±0,11	x	2,39±0,15	2,18±0,04	15,83±0,76	0,09±0,01 x
Metanol	8,75±0,11	3,59±0,28	12,60±1,12	x	3,51±0,10	3,90±0,03	77,92±0,76	0,54±0,03	x
Etanol	4,78±0,22	3,15±0,33	10,05±0,04	x	2,21±0,14	2,10±0,01	60,99±0,12	0,03±0,01	x
Su-metanol	6,07±0,34	2,59±0,28	14,47±1,10	x	3,47±0,03	1,00±0,01	14,31±1,11	0,02±0,02	x
Su-etanol	6,74±0,18	2,09±0,28	8,24±0,06	x	1,67±0,09	1,03±0,02	31,10±0,54	0,40±0,01	x
Su asit	3,10±0,21	3,21±0,15	2,01±0,11	5,34±0,05	2,64±0,06	2,43±0,03	10,98±1,13	1,25±0,03	2,16±0,01
Metanol asit	4,92±0,21	2,78±0,13	8,01±0,07	10,96±0,21	5,81±0,21	5,86±0,03	54,07±2,34	38,35±0,96	19,83±1,21
Etanol asit	3,20±0,18	2,21±0,02	8,03±0,04	8,34±0,14	2,81±0,19	3,19±0,01	45,84±4,78	8,45±0,87	5,16±0,43
Su-metanol asit	3,04±0,13	1,35±0,01	11,07±1,10	4,25±0,03	5,27±0,05	4,78±0,01	14,29±2,12	5,68±0,43	8,53±0,60
Su-etanol asit	2,99±0,11	0,98±0,01	7,13±0,06	3,27±0,29	3,07±0,13	2,45±0,01	24,31±1,25	6,24±0,32	16,73±1,28
Çözücü									
Ekstraksiyonu	Su	3,75±0,33	2,64±0,11	x	2,02±0,04	1,48±0,04	9,21±1,25	0,05±0,01	x
Metanol	6,47±0,11	3,01±0,28	10,11±0,12	x	2,58±0,03	1,90±0,03	60,53±0,76	0,24±0,03	x
Etanol	3,07±0,18	2,45±0,33	8,59±0,03	x	1,57±0,01	1,15±0,01	47,84±0,12	0,03±0,01	x
Su-metanol	5,17±0,34	2,19±0,28	13,01±0,09	x	1,37±0,01	1,01±0,01	24,38±1,11	0,02±0,02	x
Su-etanol	5,33±0,18	1,89±0,28	6,54±0,04	x	1,40±0,02	1,03±0,02	47,95±0,54	0,40±0,01	x
Su asit	2,15±0,10	3,21±0,11	1,77±0,09	2,56±0,01	1,81±0,03	1,53±0,03	7,50±1,13	1,05±0,03	1,89±0,01
Metanol asit	3,61±0,21	2,78±0,10	7,26±0,01	4,12±0,12	4,02±0,03	4,96±0,03	44,07±2,34	20,71±0,96	16,46±0,87
Etanol asit	2,78±0,22	2,21±0,04	5,23±0,04	3,98±0,09	2,99±0,01	3,12±0,01	35,84±4,78	17,05±0,87	10,87±0,09
Su-metanol asit	2,94±0,13	1,35±0,01	9,84±0,08	2,25±0,01	2,06±0,01	4,33±0,01	14,29±2,12	5,52±0,43	7,77±0,30
Su-etanol asit	1,99±0,11	0,98±0,01	4,52±0,04	1,98±0,05	3,65±0,01	2,05±0,01	20,31±1,25	4,14±0,32	3,89±0,08

İki tekrarın ortalaması ± standart sapma, x tayin edilemedi, PKA para-kumarik asit, KA kafeik asit, KLA klorojenik asit, FA ferulik asit, 2-HDSA 2-hidroksisünamik asit, RA Rosmarinik asit, KUER kuersetin, EA Ellagik asit.

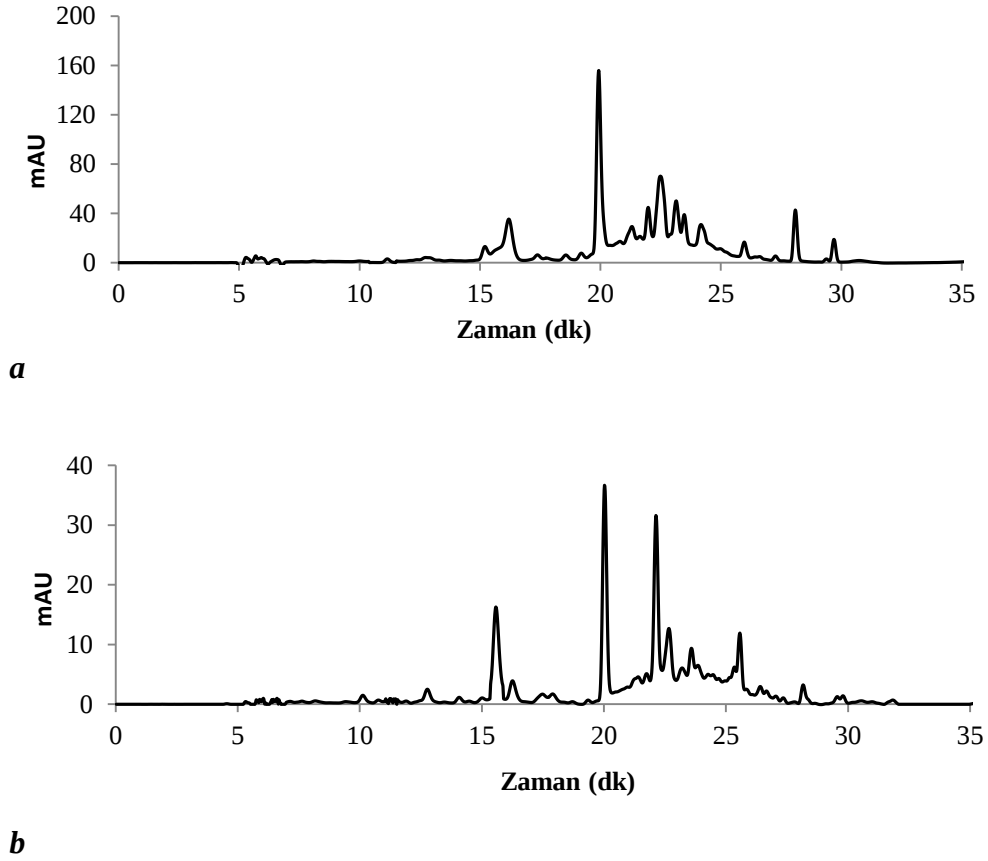
Çizelge 4.5.3.2. Ekstraksiyon metodu kullanılarak *Sorbus torminalis* L. türünde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/ kg örnek)

	Çözücüler	KL.A	KA	RA	EA	RUTİN	KAMGLK	2-HDSA	KUER	KAMFEROL
Ultrasonik Ekstraksiyon	Su	2,20±0,11	1,01±0,05	17,94±0,05	3,14±0,11	18,50±0,76	4,28±0,23	x	0,10±0,01	0,10±0,01
	Metanol	7,76±0,21	4,12±0,12	9,53±0,07	24,80±1,12	24,90±0,12	71,50±8,90	x	0,90±0,03	3,16±0,01
	Etanol	2,76±0,09	3,98±0,09	4,55±0,01	12,75±1,14	22,74±1,11	49,58±11,23	x	0,77±0,01	1,88±0,01
	Su-metanol	5,48±0,27	2,25±0,01	5,69±0,02	20,47±1,10	17,10±0,54	23,03±1,09	x	0,71±0,02	1,63±0,01
	Su-etanol	3,76±0,29	1,98±0,05	3,78±0,01	10,26±0,90	14,59±1,13	15,61±1,54	x	0,64±0,01	1,39±0,01
	Su asit	1,09±0,08	1,82±0,11	13,17±0,11	2,00±0,02	14,09±0,12	2,04±0,14	1,75±0,08	0,27±0,03	0,25±0,02
	Metanol asit	7,37±0,21	6,86±0,11	8,79±0,33	x	16,14±1,34	62,21±4,67	6,57±0,47	7,83±0,96	13,33±0,87
	Etanol asit	2,54±0,22	6,43±0,11	3,71±0,28	x	14,06±4,78	23,76±1,43	5,79±0,38	5,30±0,87	10,81±0,56
	Su-metanol asit	6,76±0,43	6,65±0,11	4,32±0,28	x	10,37±1,02	10,61±0,04	5,33±0,29	5,19±0,43	3,48±0,23
	Su-etanol asit	6,31±0,51	3,81±0,11	2,99±0,01	x	7,95±0,25	12,25±0,13	4,16±0,18	4,24±0,32	1,61±0,34
Çözücü Ekstraksiyonu	Su	1,10±0,08	1,01±0,08	12,99±0,11	2,94±0,21	17,65±0,54	3,08±0,24	x	0,10±0,01	0,10±0,01
	Metanol	7,40±0,21	3,02±0,21	8,95±0,02	15,05±1,23	20,05±1,12	63,28±4,90	x	0,71±0,02	2,89±0,01
	Etanol	3,06±0,19	2,95±0,14	3,49±0,01	6,03±1,12	10,02±0,56	52,62±4,90	x	0,63±0,24	1,80±0,01
	Su-metanol	2,96±0,11	0,25±0,03	4,46±0,02	11,67±0,98	8,57±0,45	51,21±3,90	x	0,49±0,02	1,50±0,01
	Su-etanol	3,80±0,12	0,48±0,29	3,55±0,01	9,57±0,47	10,33±0,56	19,50±1,11	x	0,30±0,01	1,23±0,01
	Su asit	1,30±0,09	1,34±0,09	11,78±0,07	x	13,79±0,12	2,10±0,14	1,15±0,08	0,21±0,02	0,15±0,02
	Metanol asit	4,19±0,12	5,39±0,11	7,78±0,03	x	12,25±3,21	45,89±1,01	6,39±0,36	5,57±0,67	9,51±0,87
	Etanol asit	2,09±0,21	4,31±0,11	2,71±0,08	x	11,52±2,18	36,08±1,89	5,57±0,42	3,38±0,54	8,04±0,56
	Su-metanol asit	2,11±0,10	5,16±0,11	4,01±0,01	x	10,26±1,68	34,32±0,21	4,39±0,26	4,15±0,36	2,48±0,23
	Su-etanol asit	2,05±0,21	2,79±0,11	3,28±0,02	x	8,37±3,89	12,18±1,10	3,39±0,29	3,14±0,21	2,83±0,34

İki tekrarın ortalaması ± standart sapma, x tayin edilemedi. PKA para-kumarik asit, KA kafeik asit, KLA klorojenik asit, FA ferulik asit, 2-HDSA 2-hidroksisünamik asit, RA Rosmarinik asit, EA Ellagik asit, KUER kuersetin, KAMGKL Kamferol glikozit.

4.5.4. *Prunus* L. türlerinde bulunan fenolik maddeler

Prunus spinosa L. ve *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* türlerinde bulunan fenolik maddelerin HPLC kromatogramları Şekil 4.5.4.1’ de verilmektedir. *Prunus spinosa* L. ve *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* türlerinde bulunan fenolik maddelerin miktarları Çizelge 4.5.4.1 ve Çizelge 4.5.4.2’de bulunmaktadır.



Şekil 4.5.4.1. *Prunus* L. türlerinin metanol-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı. *a*; *Prunus spinosa* L., *b*; *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata*

Çizelge 4.5.4.1. Ekstraksiyon metodu kullanılarak *Prunus spinosa* L. türünde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/ kg örnek)

	Çözücüler	KLA	KA	FA	PKA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR
Ultrasonik Ekstraksiyon	Su	5,40±0,43	14,54±0,04	11,33±1,05	30,37±0,31	204,54±10,12	94,38±3,23	92,85±0,65	1,12±0,01	x	0,42±0,01
	Metanol	183,18±12,34	60,48±0,11	35,09±1,21	219,21±12,12	196,54±11,12	82,03±6,90	81,34±4,21	18,69±1,03	x	7,62±0,03
	Etanol	76,06±2,12	39,80±0,14	22,41±0,14	143,27±1,14	156,84±9,78	47,88±1,23	64,97±2,12	5,50±0,01	x	1,66±0,01
	Su-metanol	123,29±9,87	34,64±0,01	20,59±0,03	132,95±1,10	175,89±10,12	62,72±2,10	56,73±2,42	5,26±0,02	x	2,95±0,02
	Su-etanol	65,96±1,18	43,82±0,06	20,58±0,29	68,85±1,89	114,09±1,25	45,86±1,03	46,75±1,28	4,22±0,01	x	2,51±0,01
	Su asit	3,71±1,67	19,38±0,04	16,27±0,06	64,44±0,43	135,06±10,76	82,08±0,23	107,15±8,98	15,35±0,03	9,23±0,02	0,90±0,01
	Metanol asit	109,33±8,56	78,58±0,11	107,09±7,21	350,89±8,76	147,99±7,12	64,07±3,90	97,86±4,87	56,62±2,96	27,62±0,57	24,69±0,42
	Etanol asit	38,90±1,57	58,22±0,14	104,74±6,19	199,78±1,14	129,24±5,11	27,16±1,23	78,43±1,78	41,05±1,87	12,66±0,06	11,09±0,97
	Su-metanol asit	63,64±5,79	47,41±0,01	35,07±2,05	176,17±1,10	128,71±1,11	41,23±1,09	65,97±3,89	37,63±1,43	23,68±0,23	22,68±0,12
	Su-etanol asit	40,25±1,80	65,63±0,06	30,79±1,13	111,90±1,89	89,25±1,13	32,33±1,54	51,16±3,78	48,27±0,32	10,76±0,34	14,55±0,11
Çözücü Ekstraksiyonu	Su	3,40±0,21	12,41±0,04	4,13±1,25	9,39±0,21	154,54±0,12	81,16±0,34	92,15±0,65	1,10±0,01	x	0,40±0,01
	Metanol	150,60±10,34	57,48±0,11	27,19±1,21	132,21±1,12	141,46±8,12	60,29±1,90	56,17±4,21	6,69±0,02	x	5,02±0,03
	Etanol	55,59±2,12	36,76±0,14	18,98±0,14	123,27±1,14	129,03±4,78	18,71±0,98	58,09±2,12	2,21±0,01	x	1,15±0,01
	Su-metanol	106,82±9,87	30,10±0,01	11,34±0,07	102,95±1,10	108,92±2,12	29,46±0,56	43,75±2,12	4,30±0,02	x	2,68±0,02
	Su-etanol	55,56±1,18	36,25±0,06	10,87±0,29	68,85±1,89	90,72±1,25	20,92±1,11	36,16±1,28	2,95±0,01	x	1,76±0,01
	Su asit	3,23±1,99	18,36±0,04	6,07±0,06	34,44±0,43	122,20±8,76	61,08±0,03	97,16±0,98	11,16±0,03	8,20±0,02	0,95±0,01
	Metanol asit	85,37±3,56	70,80±0,11	57,09±0,21	209,42±8,76	105,80±8,12	54,07±3,90	65,07±3,87	30,48±0,96	16,24±0,07	20,69±1,42
	Etanol asit	38,29±2,12	48,02±0,14	34,74±0,19	157,78±1,14	104,09±1,11	16,16±1,23	61,07±1,78	29,10±0,87	12,94±0,06	10,09±0,97
	Su-metanol asit	76,06±1,56	37,77±0,01	21,21±0,05	167,17±1,10	83,20±0,54	21,23±1,09	59,19±3,89	12,19±0,43	14,64±0,03	12,08±0,12
	Su-etanol asit	29,15±1,67	55,63±0,46	20,09±0,13	186,90±1,89	67,98±1,13	12,33±1,04	44,28±3,78	17,57±0,32	9,94±0,05	13,15±0,11

İki tekrarın ortalaması ± standart sapma, x tayin edilemedi. *KLA* klorojenik asit, *KA* kafeik asit, *FA* ferulik asit, *PKA* para-kumarik asit, *KAMGLK* kamferol glikozit, *ISOKUER* isokuersetin, *KUER* kuersetin, *KAM* kamferol, *MR* mirisetin.

Çizelge 4.5.4.1. Ekstraksiyon metodu kullanılarak *Prunus spinosa* L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/ kg örnek) (Devam)

	Çözücüler	SİYANİDİN GLİKOZİT	SİYANİDİN RUTİNOZİT	DELFINİDİN	SİYANİDİN
Ultrasonik ekstraksiyon	Su	62,58±3,21	206,91±11,22	77,31±4,12	32,60±2,31
	Metanol	54,13±2,12	187,56±8,98	50,93±2,36	32,20±2,56
	Etanol	48,62±3,01	157,63±6,45	47,90±1,23	21,89±1,23
	Su-metanol	53,88±1,55	123,56±4,23	48,14±1,14	22,14±1,12
	Su-etanol	42,29±2,14	103,43±4,74	40,10±2,31	21,47±1,01
	Su asit	39,20±1,96	152,30±10,23	131,45±10,53	83,56±5,63
	Metanol asit	29,02±0,06	131,08±9,86	97,41±6,34	82,15±4,63
	Etanol asit	18,13±0,01	91,68±7,52	77,05±5,03	32,02±2,01
	Su-metanol asit	24,02±1,24	82,10±5,69	73,30±2,74	72,47±5,63
	Su-etanol asit	15,74±0,08	87,04±4,23	65,21±1,85	31,83±1,02
Çözücü Ekstraksiyonu	Su	56,87±4,12	186,31±10,23	65,31±2,95	28,33±1,56
	Metanol	40,21±3,04	128,32±8,56	40,24±3,01	22,10±1,05
	Etanol	37,10±2,14	102,87±7,51	35,90±1,11	21,57±1,45
	Su-metanol	39,88±2,05	112,74±4,32	45,93±2,33	22,11±1,99
	Su-etanol	37,35±2,14	96,52±1,36	37,98±1,47	21,05±1,53
	Su asit	23,17±0,12	105,49±9,63	101,23±8,63	72,78±5,47
	Metanol asit	19,10±0,09	109,56±3,26	65,21±4,53	72,39±6,23
	Etanol asit	11,30±0,03	88,07±4,12	42,69±3,12	31,97±1,50
	Su-metanol asit	14,17±0,07	95,02±2,36	63,01±4,89	72,24±4,63
	Su-etanol asit	13,58±0,04	92,78±4,23	56,90±3,65	31,34±1,58

İki tekrarın ortalaması ± standart sapma

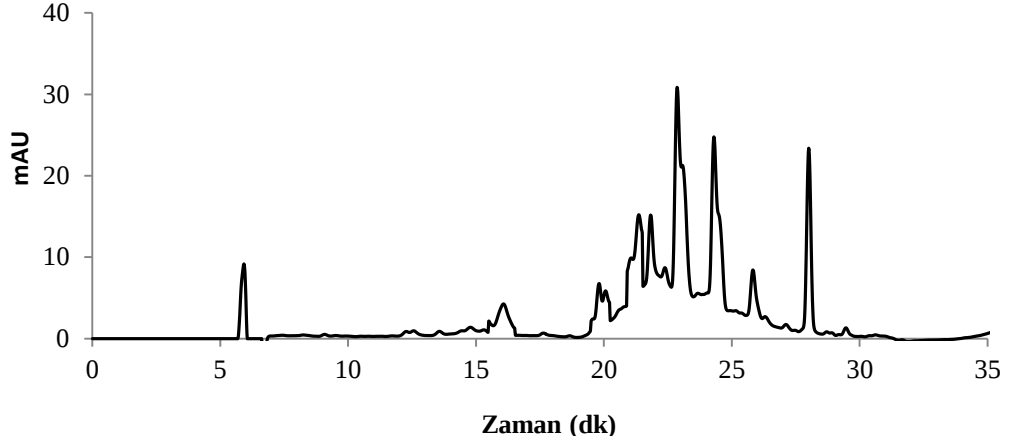
Çizelge 4.5.4.2. Ekstraksiyon metodu kullanılarak *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* türünde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/ kg örnek)

	Çözücüler	KLA	KA	FA	PKA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR
Ultrasonik Ekstraksiyon	Su	3,10±0,03	5,14±0,04	7,11±1,05	10,05±0,31	124,04±8,12	54,08±3,03	42,15±1,65	10,12±0,61	6,23±0,02	3,42±0,21
	Metanol	18,31±1,34	20,03±0,81	15,87±1,21	21,86±1,12	96,07±11,23	42,14±2,90	61,03±4,01	38,69±1,03	17,62±0,57	17,62±1,03
	Etanol	7,606±0,02	12,08±0,14	12,03±0,14	14,33±1,14	86,18±5,08	37,99±1,47	54,07±3,02	25,50±1,01	10,66±0,06	8,66±0,41
	Su-metanol	12,39±0,87	9,11±0,05	10,05±0,03	13,55±1,01	75,09±1,11	44,13±2,01	46,33±1,22	15,26±0,92	14,68±0,23	12,95±0,82
	Su-etanol	6,59±0,18	13,12±0,06	10,22±0,29	18,45±0,99	64,09±1,15	35,06±1,04	43,22±1,08	34,22±2,01	21,76±0,34	11,51±0,31
	Su asit	2,11±0,07	9,008±0,04	9,07±0,06	14,01±0,43	95,14±6,06	42,15±1,23	57,18±4,12	15,35±0,83	11,23±0,02	5,90±0,11
	Metanol asit	10,93±0,56	28,42±1,01	37,66±7,21	25,09±1,15	77,11±2,11	34,03±1,08	64,11±3,12	56,62±2,96	37,62±0,57	24,69±0,42
	Etanol asit	3,08±0,17	18,47±0,14	34,14±6,19	19,18±1,14	49,14±5,01	27,10±1,01	58,03±3,01	41,05±1,87	22,66±0,06	11,09±0,97
	Su-metanol asit	6,34±0,09	17,11±0,01	15,01±2,05	17,07±1,02	58,77±1,11	31,02±1,03	55,89±2,19	37,63±1,43	27,68±0,23	22,68±0,12
	Su-etanol asit	4,05±0,10	20,78±0,06	20,41±1,13	21,09±1,09	49,05±1,13	29,36±1,07	41,02±1,77	48,27±2,32	30,76±0,34	14,55±0,11
Çözücü Ekstraksiyonu	Su	2,04±0,11	2,01±0,04	2,65±1,25	6,13±0,21	84,44±3,02	41,89±2,34	42,32±0,65	7,10±0,41	5,20±0,02	2,40±0,01
	Metanol	15,06±1,34	17,08±0,11	11,11±1,21	13,01±0,92	71,76±4,11	30,56±1,11	36,13±1,11	16,69±0,72	14,24±0,07	11,02±0,63
	Etanol	5,55±0,12	8,23±0,14	8,08±0,14	12,17±1,01	59,33±4,08	28,41±1,08	30,14±2,12	12,21±0,51	8,94±0,06	6,15±0,21
	Su-metanol	10,62±1,87	10,68±0,01	9,24±0,07	10,15±0,89	57,02±2,12	39,46±1,56	23,16±0,92	8,30±0,62	10,64±0,03	8,68±0,12
	Su-etanol	5,06±0,18	6,09±0,06	8,17±0,29	8,85±0,43	40,22±1,25	24,02±1,01	26,07±1,28	12,95±0,91	9,94±0,05	4,76±0,11
	Su asit	1,23±0,99	3,80±0,04	5,09±0,06	10,05±0,43	74,27±2,06	31,17±2,03	55,14±0,98	11,16±0,93	8,20±0,02	4,95±0,01
	Metanol asit	8,57±0,56	20,54±0,11	27,58±0,21	20,22±0,89	65,89±1,02	24,36±1,90	49,04±3,01	30,48±1,96	26,24±0,07	20,69±1,42
	Etanol asit	3,10±0,12	11,02±0,14	14,51±0,19	15,08±1,14	44,69±1,11	19,01±0,99	44,17±1,54	29,10±0,87	18,94±0,06	10,09±0,97
	Su-metanol asit	7,76±0,56	13,11±0,01	11,00±0,05	16,11±1,10	51,50±0,34	21,15±1,01	31,99±1,36	12,19±0,43	20,64±0,03	12,08±0,12
	Su-etanol asit	2,05±0,07	15,03±0,46	10,79±0,13	18,34±1,01	37,18±1,11	15,51±1,01	37,63±2,11	17,57±0,32	19,94±0,05	13,15±0,11

İki tekrarın ortalaması ± standart sapma, x tayin edilemedi. KLA klorojenik asit, KA kafeik asit, FA ferulik asit, PKA para-kumarik asit, KAMGLK kamferol glikozit, ISOKUER isokuersetin, KUER kuersetin, KAM kamferol, MR mirisetin.

4.5.5. *Diospyros lotus* L. türünde bulunan fenolik maddeler

Diospyros lotus L. türünde bulunan fenolik maddelerin HPLC kromatogramı Şekil 4.5.5.1’ de ve bulunan fenolik maddelerin miktarları Çizelge 4.5.5.1 de verilmektedir.



Şekil 4.5.5.1. *Diospyros lotus* L. metanol-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı

Çizelge 4.5.5.1. Ekstraksiyon metodu kullanılarak *Diospyros lotus* L. türünde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/ kg örnek)

Çözücüler	GA	KA	RA	EA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR	KLA
Ultrasonik Ekstraksiyon	Su	138,88±9,43	0,70±0,04	1,12±0,05	4,44±0,31	8,50±0,76	4,68±0,23	14,75±0,98	0,12±0,01	x	x
	Metanol	174,52±12,34	2,52±0,11	5,53±0,21	28,75±1,12	20,45±0,12	138,30±8,90	183,54±9,87	0,80±0,03	x	x
	Etanol	95,09±8,12	2,40±0,14	3,49±0,14	19,46±1,14	14,52±1,11	137,64±11,23	145,75±10,78	0,40±0,01	x	x
	Su-metanol	121,91±9,87	0,33±0,01	0,58±0,03	13,09±1,10	9,37±0,54	12,79±1,09	43,98±3,89	0,52±0,02	x	x
	Su-etanol	165,12±10,18	1,04±0,06	4,27±0,29	20,26±1,89	14,44±1,13	18,39±1,54	69,90±3,78	0,46±0,01	x	x
	Su asit	243,02±14,67	x	1,02±0,06	5,92±0,43	4,29±0,12	2,14±0,14	9,80±0,65	0,57±0,03	0,45±0,02	2,24±0,01
	Metanol asit	348,36±23,56	x	4,98±0,21	106,47±8,76	75,45±2,34	22,23±1,67	59,21±4,21	11,91±0,96	10,13±0,87	6,78±0,42
	Etanol asit	283,69±14,57	x	3,13±0,19	104,79±6,89	74,26±4,78	18,68±1,43	47,87±2,12	11,42±0,87	9,35±0,56	17,05±0,97
	Su-metanol asit	253,04±15,79	x	0,76±0,05	42,78±3,21	30,37±2,12	4,37±0,34	33,90±1,90	5,35±0,43	4,05±0,23	3,44±0,12
	Su-etanol asit	309,25±19,80	x	3,17±0,13	67,62±4,90	47,95±1,25	15,00±0,13	46,75±1,28	6,24±0,32	5,40±0,34	4,23±0,11
Çözücü Ekstraksiyonu	Su	108,50±7,67	0,56±0,03	1,02±0,04	4,04±0,21	7,65±0,54	4,08±0,34	10,15±0,76	0,10±0,01	x	x
	Metanol	154,12±9,90	2,12±0,07	5,12±0,03	25,05±1,23	20,05±1,12	129,49±10,90	113,32±10,12	0,69±0,02	x	x
	Etanol	85,90±5,12	1,98±0,01	3,09±0,01	16,03±1,12	10,02±0,56	117,78±9,98	95,75±2,14	0,37±0,24	x	x
	Su-metanol	111,01±9,98	0,25±0,01	0,45±0,01	11,00±0,98	8,57±0,45	10,19±0,56	40,98±2,89	0,45±0,02	x	x
	Su-etanol	135,56±7,78	0,98±0,05	4,07±0,02	20,16±0,17	10,33±0,56	14,47±1,11	61,01±2,56	0,30±0,01	x	x
	Su asit	143,23±8,99	x	0,98±0,03	4,98±0,21	3,29±0,12	2,10±0,14	8,55±0,45	0,51±0,02	0,40±0,01	2,00±0,013
	Metanol asit	248,06±15,89	x	4,02±0,03	96,17±3,43	55,98±3,21	19,53±1,01	55,01±3,21	10,71±0,67	9,98±0,04	15,15±1,15
	Etanol asit	183,19±15,90	x	2,89±0,01	84,09±2,89	70,16±2,18	16,08±1,89	34,87±2,19	10,42±0,54	8,65±0,74	5,98±0,41
	Su-metanol asit	153,12±11,56	x	0,31±0,01	31,78±1,12	20,17±1,68	4,32±0,21	26,87±1,13	4,95±0,16	3,95±0,21	3,04±0,12
	Su-etanol asit	209,15±10,67	x	3,19±0,01	53,62±2,67	45,05±3,89	12,68±1,10	43,15±1,89	5,14±0,41	4,30±0,34	3,97±0,21

İki tekrarın ortalaması ± standart sapma, x tayin edilemedi. KLA klorojenik asit, KA kafeik asit, RA rosmarinik asit, EA ellagik asit, GA gallik asit, KAMGLK kamferol glikozit, ISOKUER isokuersetin, KUER kuersetin, KAM kamferol, MR mirisetin.

4.5.6. Analitik yöntem validasyonu

Yabani meyve türlerinin fenolik bileşiklerinin derişimlerinin tayininin validasyonunda her fenolik bileşik tayini için IUPAC tarafından belirtilen LOD (3s/m), LOQ (10s/m) ve yüzde geri kazanım değerleri (Çizelge 4.5.6.1) hesaplanmıştır. Burada s; kör örnek için standart sapmasını, m; kalibrasyon eğrisinin eğim değerini ifade etmektedir. Ekstraksiyon yönteminin geri kazanım değerinin ve uygulanan analitik yöntemin validasyonunun hesaplanabilmesi için 100 mg/L çözelti kullanılmıştır. Bu çözeltiden % geri kazanım değerinin hesaplanmasında içerisinde 10 mg/L standart madde içeren ekstraktlar kullanılmıştır. Bu ekstraktlar, *Prunus spinosa* L. türünün metanol ve metanol-asit ekstraktlarıdır. Uygulanan analitik yöntemin validasyonunda kullanılan çözeltiler stok ana çözelti kullanılarak her bir standart fenolik bileşik için 1 mg/L derişimine sahip çözeltilerdir.

Çizelge 4.5.6.1. Analitik yöntem validasyonu ve geri kazanım değerleri (n=3)

Fenolik bileşikler	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Geri kazanım (%)	
			Ekstraksiyon	Asidik hidroliz
Kuersetin	0,17	0,51	90±3	99±2
Rutin	0,15	0,46	82±2	71±1
Rosmarinik asit	0,18	0,57	95±4	91±4
Kafeik asit	0,28	0,86	89±2	74±3
Klorojenik asit	0,23	0,69	90±4	87±4
Ferulik asit	0,14	0,43	92±2	103±2
P-kumarik asit	0,10	0,32	91±2	99±1
Ellagik asit	0,17	0,52	91±1	99±2
Gallik asit	0,15	0,47	102±3	81±1
Mirisetin	0,25	0,77	85±2	81±4
Kamferol	0,18	0,55	83±4	84±3
Kamferol glikozit	0,23	0,74	96±3	73±4
Isokuersetin	0,24	0,72	92±2	90±1
2-Hidroksisinamik asit	0,21	0,63	89±1	88±1
Siyanidin	0,15	0,46	90±4	90±4
Delfinidin	0,15	0,48	90±4	89±1
Siyanidin glukozit	0,16	0,45	86±2	76±1
Siyanidin rutinosit	0,17	0,47	88±2	77±2

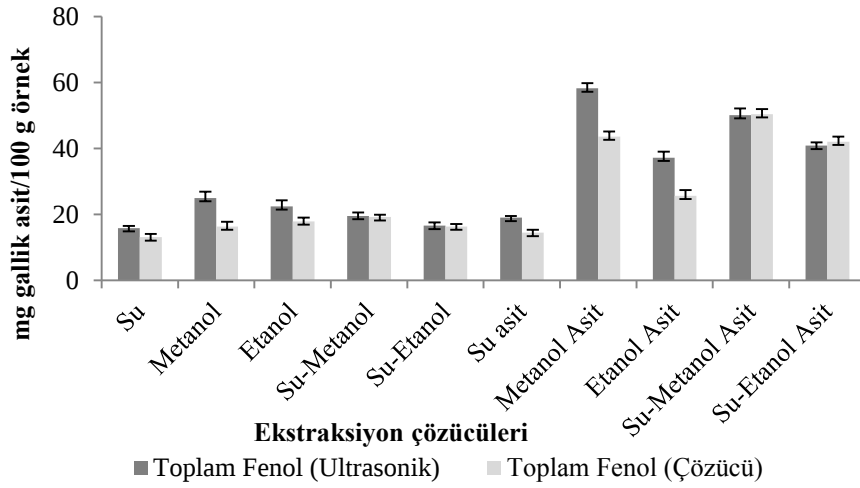
LOD tayin sınırı, LOQ tayin edilebilen en küçük derişim

4.6. Spektroskopik Yöntemler

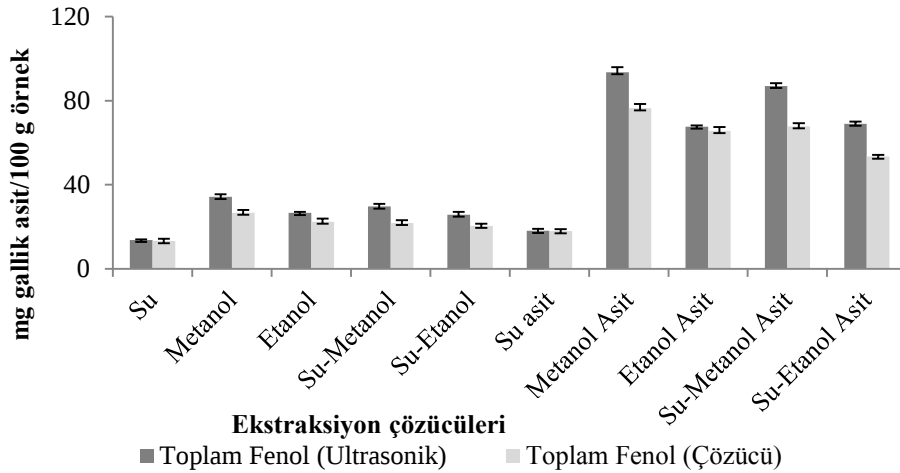
Sorbus L., *Prunus* L., ve *Diospyros* L., türlerinin meyvelerindeki toplam fenol tayinleri, toplam flavonoid tayini ve antioksidan kapasite tayinleri spektroskopik yöntemle yapılmıştır.

4.6.1. Toplam fenol miktarları

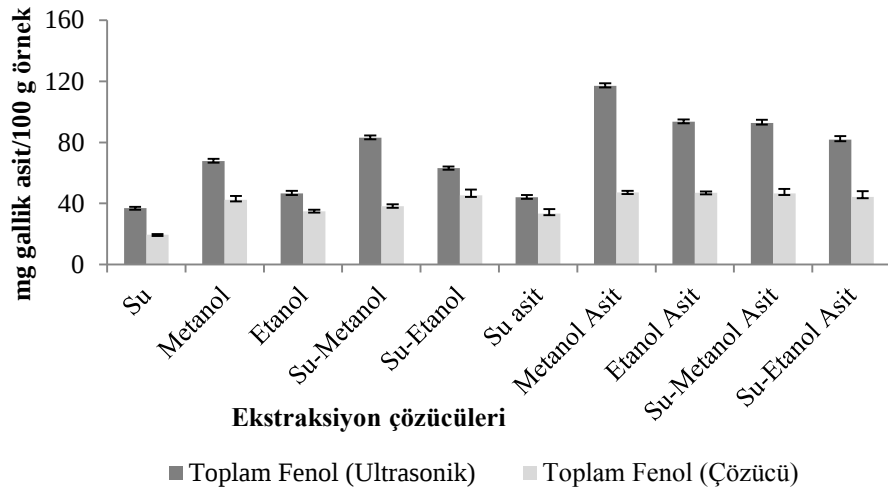
Sorbus L., *Prunus* L., ve *Diospyros* L., türlerinin meyveleri için su, metanol, etanol, su-metanol, su-etanol ve bunların asidik ekstraktlarının toplam fenol miktarları Folin yöntemiyle tayin edilmiştir. Bulunan toplam fenol miktarları Şekil 4.6.1.1- 4.6.1.5'te verilmektedir.



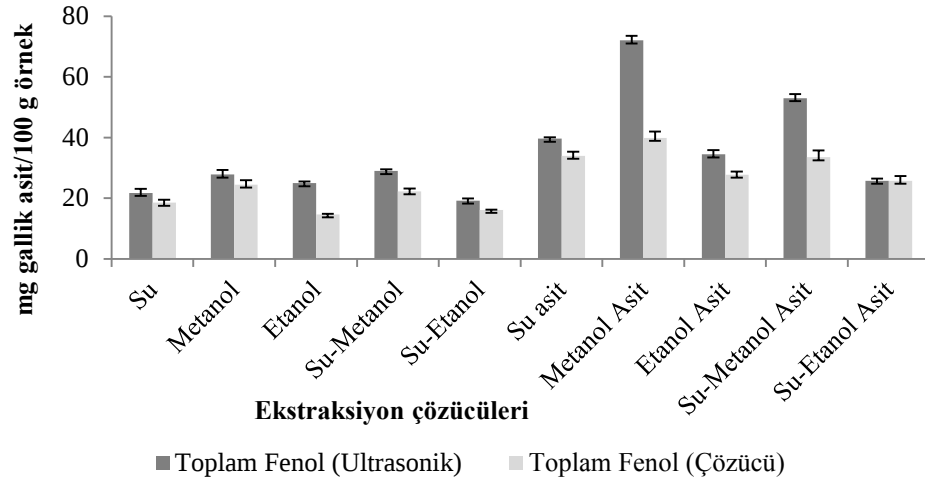
Şekil 4.6.1.1. *Sorbus domestica* L. için toplam fenol miktarları



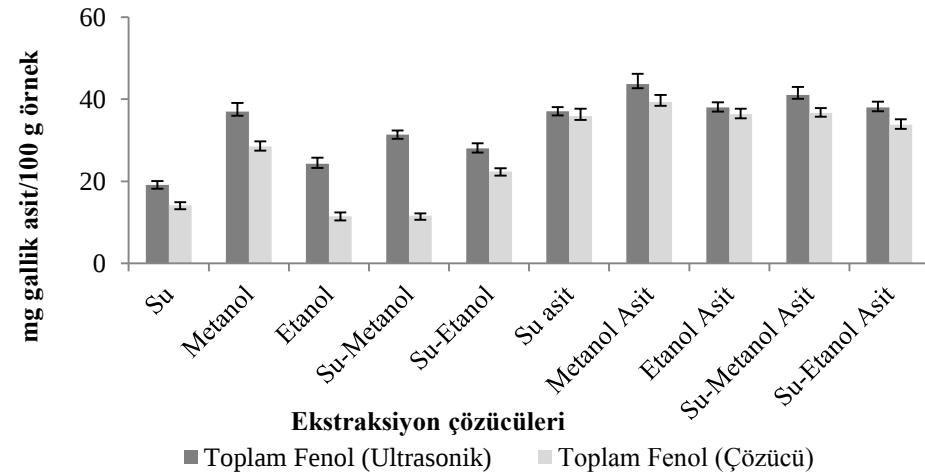
Şekil 4.6.1.2. *Sorbus torminalis* L. için toplam fenol miktarları



Şekil 4.6.1.3. *Prunus spinosa* L. için toplam fenol miktarları



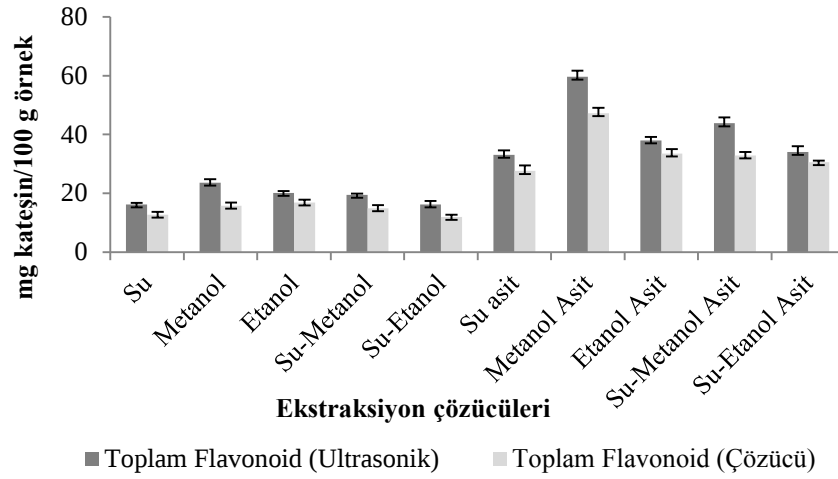
Şekil 4.6.1.4. *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* için toplam fenol miktarları



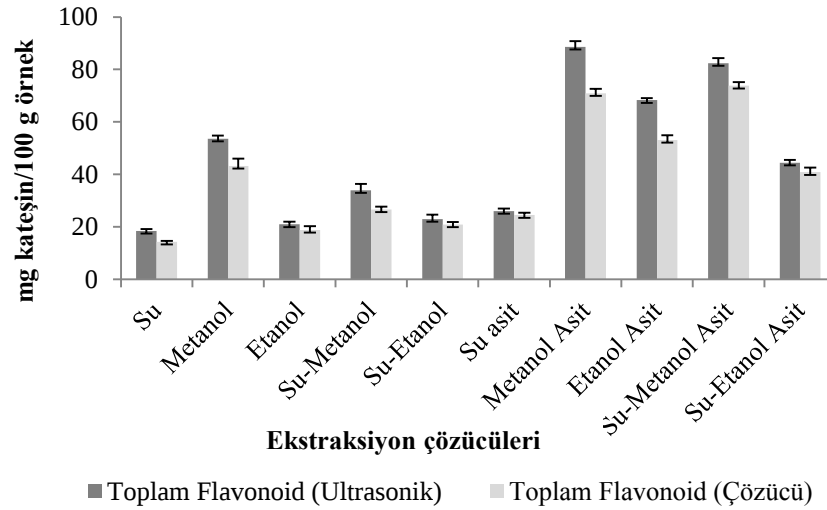
Şekil 4.6.1.5. *Diospyros lotus* L. için toplam fenol miktarları

4.6.2. Toplam flavonoid miktarları

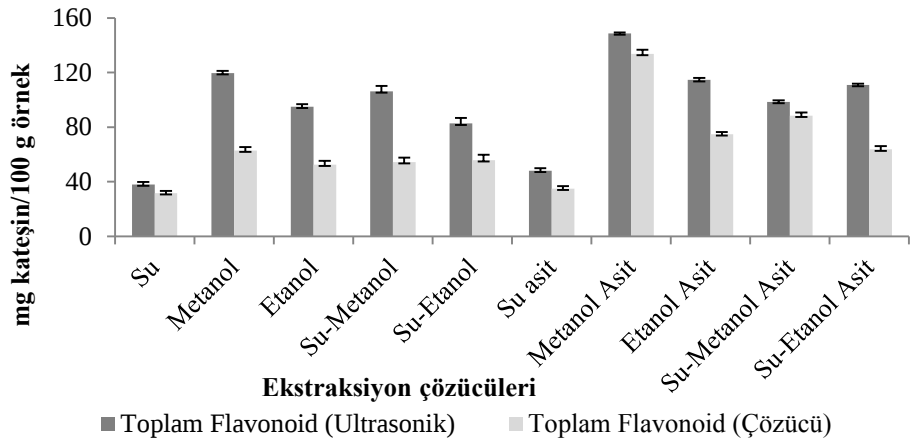
Sorbus L., *Prunus* L., ve *Diospyros* L., türlerinin meyveleri için su, metanol, etanol, su-metanol, su-etanol ve bunların asidik ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları Şekil 4.6.2.1- 4.6.2.5' te verilmiştir.



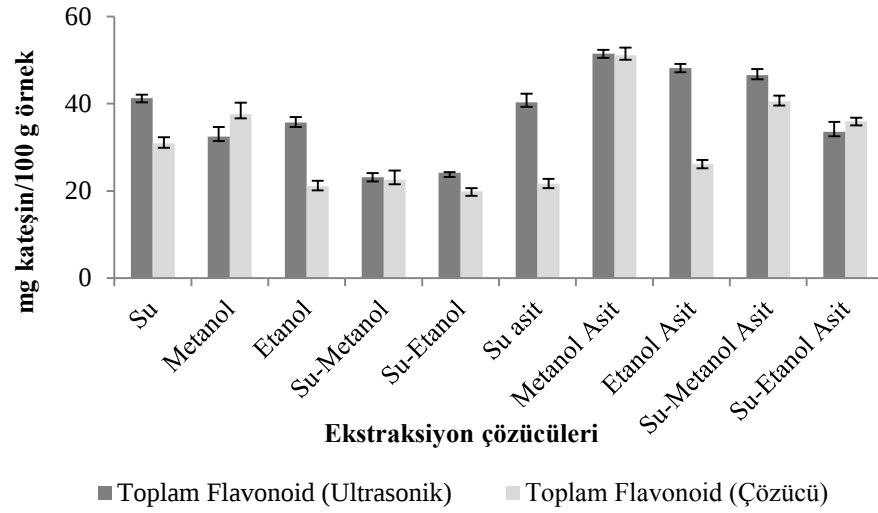
Şekil 4.6.2.1. *Sorbus domestica* L. için toplam flavonoid miktarları



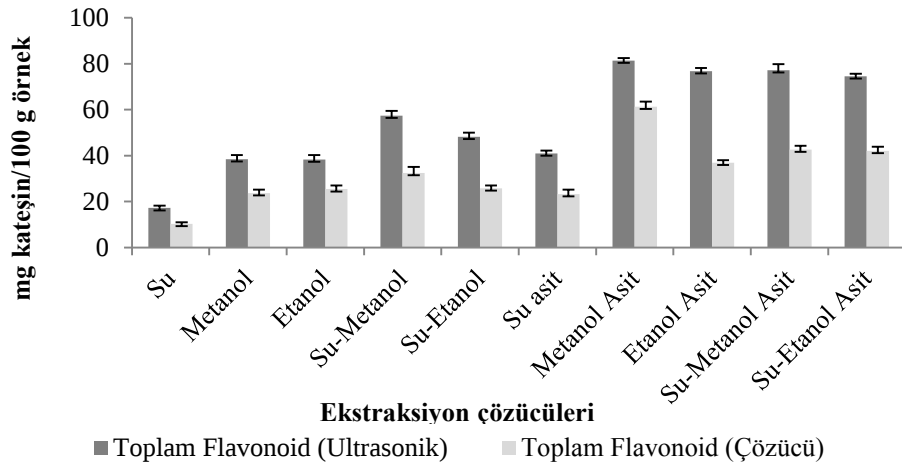
Şekil 4.6.2.2. *Sorbus torminalis* L. için toplam flavonoid miktarları



Şekil 4.6.2.3. *Prunus spinosa* L. için toplam flavonoid miktarları



Şekil 4.6.2.4. *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* için toplam flavonoid miktarları



Şekil 4.6.2.5. *Diospyros lotus* L. için toplam flavonoid miktarları

4.6.3. Antioksidan kapasite miktarları

Sorbus L., *Prunus* L., ve *Diospyros* L., türlerinin meyveleri için su, metanol, etanol, su-metanol, su-etanol ve bunların asidik ekstraktlarının ABTS, CUPRAC ve CHROMAC metotları ile antioksidan kapasite tayinleri yapılmıştır. Yabani meyve türlerinin ABTS, CUPRAC ve CHROMAC metotları ile bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri Çizelge 4.6.3.1-Çizelge 4.6.3.5’de verilmiştir. Antioksidan kapasite sonuçları μmol troloks/g örnek şeklinde hesaplanmıştır.

Çizelge 4.6.3.1. *Sorbus domestica* L. için antioksidan kapasite değerleri (μmol troloks/g örnek)

	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Su	1,42±0,05	1,31±0,09	1,26±0,08	1,08±0,09	1,04±0,08	0,98±0,04
Metanol	2,70±0,12	2,59±0,15	2,92±0,17	2,66±0,08	2,31±0,08	2,70±0,09
Etanol	2,49±0,11	2,33±0,19	2,86±0,10	2,02±0,15	2,13±0,16	2,80±0,14
Su-metanol	2,48±0,10	2,62±0,20	2,74±0,11	2,05±0,19	2,11±0,14	2,19±0,12
Su-etanol	2,14±0,16	2,42±0,14	2,45±0,16	1,45±0,07	1,58±0,07	1,14±0,07
Su asit	2,52±0,11	2,29±0,12	2,82±0,18	1,82±0,05	2,04±0,13	1,95±0,06
Metanol asit	5,87±0,45	5,90±0,44	5,81±0,32	5,65±0,36	5,68±0,33	5,26±0,36
Etanol asit	4,70±0,39	4,54±0,38	4,26±0,31	4,46±0,39	4,45±0,22	4,18±0,31
Su-metanol asit	4,17±0,21	4,11±0,26	4,18±0,26	4,50±0,10	4,17±0,21	4,66±0,21
Su-etanol asit	3,09±0,21	3,04±0,16	3,71±0,28	3,17±0,24	3,21±0,22	3,70±0,24

Çizelge 4.6.3.2. *Sorbus torminalis* L. için antioksidan kapasite değerleri (μmol troloks/ g örnek)

	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Su	1,88±0,11	1,91±0,09	1,52±0,10	1,28±0,11	1,43±0,09	1,14±0,10
Metanol	3,26±0,18	4,16±0,13	4,75±0,16	3,23±0,19	3,99±0,16	3,66±0,21
Etanol	2,27±0,23	2,31±0,10	2,13±0,14	2,27±0,25	2,02±0,34	2,25±0,11
Su-metanol	3,09±0,19	3,53±0,24	3,64±0,28	3,07±0,19	3,03±0,29	3,21±0,25
Su-etanol	2,39±0,20	3,12±0,21	3,33±0,27	2,86±0,20	2,56±0,19	2,24±0,13
Su asit	4,66±0,34	3,27±0,19	4,18±0,34	2,86±0,21	3,03±0,25	3,09±0,24
Metanol asit	6,44±0,41	6,85±0,52	6,10±0,48	5,38±0,35	5,11±0,35	5,14±0,35
Etanol asit	5,67±0,40	6,49±0,49	5,95±0,31	4,31±0,32	4,41±0,39	4,64±0,30
Su-metanol asit	5,14±0,39	5,23±0,39	5,33±0,27	5,04±0,46	5,13±0,42	5,03±0,42
Su-etanol asit	4,87±0,29	4,16±0,11	4,92±0,27	4,41±0,38	4,86±0,37	4,23±0,39

Çizelge 4.6.3.3. *Prunus spinosa* L. için antioksidan kapasite değerleri (µmol troloks/ g örnek)

	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Su	6,53±0,41	6,35±0,55	6,76±0,45	3,20±0,22	4,16±0,11	3,04±0,21
Metanol	14,66±0,95	14,21±1,15	14,82±0,99	10,42±0,85	10,60±0,99	9,73±0,63
Etanol	9,42±0,72	8,96±0,69	8,68±0,72	6,21±0,47	6,88±0,33	6,84±0,59
Su-metanol	9,36±0,66	9,71±0,55	9,35±0,69	7,68±0,32	7,32±0,41	7,42±0,21
Su-etanol	8,79±0,97	8,72±0,55	8,52±0,96	5,22±0,31	5,29±0,60	5,57±0,46
Su asit	7,47±0,26	8,38±0,59	7,49±0,42	6,84±0,43	6,65±0,34	6,02±0,41
Metanol asit	20,54±1,05	22,09±1,23	20,02±1,01	18,51±1,22	17,10±1,13	18,77±1,11
Etanol asit	15,72±1,03	15,14±1,20	15,69±0,94	13,12±1,05	13,98±1,05	13,18±1,03
Su-metanol asit	17,66±0,98	17,75±0,97	17,08±1,02	14,77±0,98	14,70±1,01	14,19±1,00
Su-etanol asit	13,94±1,23	13,60±1,14	13,92±1,42	11,38±1,01	11,48±0,99	11,08±1,01

Çizelge 4.6.3.4. *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata* için antioksidan kapasite değerleri (µmol troloks/g örnek)

	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Su	1,61±0,09	2,60±0,12	1,76±0,08	1,02±0,05	1,93±0,07	1,56±0,06
Metanol	4,50±0,36	4,29±0,25	4,25±0,31	2,42±0,15	3,69±0,21	3,24±0,15
Etanol	4,11±0,29	3,87±0,26	3,45±0,24	2,41±0,12	3,34±0,19	3,28±0,21
Su-metanol	3,77±0,24	3,82±0,11	4,71±0,25	4,01±0,11	3,21±0,27	3,97±0,09
Su-etanol	2,64±0,11	3,01±0,28	3,07±0,29	3,55±0,09	3,07±0,26	3,60±0,16
Su asit	2,37±0,12	3,84±0,23	3,66±0,19	2,10±0,10	3,78±0,24	2,70±0,15
Metanol asit	12,74±0,95	12,20±0,87	12,80±0,81	9,94±0,45	9,12±0,42	9,99±0,47
Etanol asit	8,06±0,67	8,39±0,67	8,43±0,98	7,31±0,35	7,95±0,74	7,85±0,61
Su-metanol asit	9,35±0,65	9,58±0,49	9,51±0,84	8,16±0,23	8,00±0,66	8,76±0,69
Su-etanol asit	6,97±0,41	6,05±0,39	6,61±0,52	5,57±0,45	5,35±0,54	5,33±0,30

Çizelge 4.6.3.5. *Diospyros lotus* L. için antioksidan kapasite değerleri (µmol troloks/ g örnek)

	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Su	2,56±0,11	2,93±0,17	3,06±0,21	2,46±0,14	2,51±0,11	2,68±0,09
Metanol	4,22±0,34	4,19±0,34	3,78±0,21	2,47±0,09	3,06±0,22	2,45±0,12
Etanol	3,90±0,21	3,17±0,27	3,89±0,11	2,77±0,11	2,40±0,16	2,33±0,18
Su-metanol	4,25±0,33	4,87±0,31	4,88±0,35	4,05±0,19	3,73±0,18	4,09±0,33
Su-etanol	3,24±0,27	3,44±0,30	3,14±0,28	3,09±0,22	3,38±0,34	3,16±0,20
Su asit	4,19±0,38	4,13±0,28	4,00±0,31	3,86±0,34	3,68±0,27	3,66±0,27
Metanol asit	6,53±0,41	6,70±0,51	6,75±0,44	4,85±0,22	4,56±0,36	4,90±0,21
Etanol asit	4,19±0,39	5,07±0,43	5,22±0,48	3,15±0,16	3,42±0,11	3,84±0,19
Su-metanol asit	5,19±0,34	4,74±0,35	4,73±0,34	4,19±0,34	4,14±0,27	3,99±0,19
Su-etanol asit	3,44±0,29	3,57±0,26	3,63±0,36	3,09±0,19	3,50±0,20	3,65±0,28

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Kromatografik Yöntemler

Bu çalışmada Bursa’da doğal yetişen *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., türü meyveler için ultrasonik ve çözücü ekstraksiyonları uygulanarak örnek hazırlama teknikleri geliştirilmiş ve yabani meyvelerde bulunan fenolik maddeler, kantitatif olarak HPLC-DAD ile belirlenmiştir. Analiz edilen yabani meyve türlerinin zengin fenolik madde içeriğine ve antioksidan kapasite değerine sahip olduğu bulunmuştur.

Çözücü ekstraksiyonu meyvelerde ve bitkilerde bulunan fenolik asitler ve flavonoidleri içine alan çeşitli bileşiklerin ekstraksiyonunda yaygın kullanılan bir metottur. Fenolik bileşikler polar moleküllerdir ve dolayısıyla bu bileşiklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak su, metanol ve bunların farklı oranlardaki karışımları ile asitli çözücüler kullanılır. Asitli çözücü ekstraksiyonunun fenolik bileşiklerin asetil ve glikozit bağlarını kırabildiği ve fenolik bileşiklerin serbest hale geçmesini sağladığı belirtilmiştir (Rommel ve Wrolstad 1993). Bu çalışmada *Sorbus domestica* L., *Sorbus torminalis* L., *Prunus divaricata* L., *Prunus spinosa* L., ve *Diospyros lotus* L. türlerinde bulunan fenolik maddeler HPLC-DAD ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Fenolik maddelerin tayininde çözücü ve ultrasonik ekstraksiyon olmak üzere iki tür ekstraksiyon tekniği uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan ultrasonik ekstraksiyonda çözücü ekstraksiyonuna göre daha verimli sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Ayrıca yabani meyvelerde bulunan glikozit yapılarının serbest hale geçmesi için asidik, bazik, asidik-bazik ve enzimatik hidroliz uygulanmıştır. Bazik ve asidik-bazik hidroliz ekstraktlarında tayin edilmek istenen fenolik maddelere ait pik gözlenmemiştir. Enzimatik hidrolizde ise beta-glikozidaz enzimi ile glikozit yapılarının parçalanarak serbest halde daha fazla fenolik madde tayin edilmek istenmiştir ancak verimli sonuç alınamamıştır. Asidik hidroliz ekstraktlarında ise çözgen ekstraktlarına oranla kalitatif ve kantitatif olarak daha fazla fenolik madde tayini yapılmıştır. Uygulanan diğer hidroliz teknikleri için elde edilen sonuçlar Ek 4 de sunulmuştur. *S. domestica* L., *S. torminalis* L., *P. divaricata* L., ve *D. lotus* L. türlerinin ultrasonik ve çözücü ekstraksiyonlarına uygulanan bazik, asidik-bazik ve enzimatik hidroliz sonrası fenolik madde tayini yapılamamıştır. *P. spinosa* L. türünde ise bazik ve asidik-bazik

hidrolizde herhangi bir fenolik madde gözlenmemiştir. Ancak enzimatik hidroliz uygulandığında ultrasonik ekstraksiyonda rutin, kamferol glikozit, kuersetin ve kamferol; çözücü ekstraksiyonunda ise kafeik asit, rutin ve kuersetin tayin edilmiştir.

5.1.1. *Sorbus L.* türlerinde bulunan fenolik maddelerin HPLC-DAD sonuçları

Sorbus torminalis L. ve *Sorbus domestica* L. türlerinde bulunan fenolik maddeler HPLC-DAD cihazı ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Klorojenik asit, kafeik asit, rutin, kuersetin ve 2-hidroksisinamik asit *Sorbus L.* türleri için ortak fenolik maddelerdir. *Sorbus domestica* L. türünde ferulik asit ve p-kumarik asit tayin edilirken *Sorbus torminalis* L. türünde rosmarinik asit, ellagik asit, kamferol glikozit ve kamferol tayin edilen farklı fenolik maddelerdir. *S. domestica* L. türlerinde bulunan fenolik maddelerin miktarları Çizelge 4.1.2.1 ve *S. torminalis* L. türü için bulunan fenolik madde miktarları Çizelge 4.1.2.2’de verilmiştir. Kafeik asit ($3,27\pm0,29$ - $10,96\pm0,21$ mg/kg örnek) ve 2-hidroksisinamik asit ($2,16\pm0,01$ - $19,83\pm1,21$ mg/kg örnek) *S. domestica* L. türünde çözücü ekstraksiyonunda değil asidik hidrolizi sonucunda tayin edilmiştir. Ferulik asidin ve p-kumarik asidin ise asidik hidroliz sonrası miktarlarında artış olduğu gözlenmiştir. Ferulik asit çözücü ekstraksiyonunda $1,37\pm0,01$ - $3,51\pm0,10$ mg/kg örnek aralığında değere sahipken asidik hidroliz sonrası $1,81\pm0,03$ - $5,81\pm0,21$ mg/kg örnek değere sahip olduğu görülmüştür. Aynı şekilde p- kumarik asitte çözücü ekstraksiyonunda $1,00\pm0,01$ - $3,90\pm0,03$ mg/kg örnek değerde iken asidik hidroliz sonrası $1,53\pm0,03$ - $5,86\pm0,03$ mg/kg örnek değerde olduğu bulunmuştur. Asidik hidroliz ile gözlenen artışlar ve fenolik maddeler tayin edilemeyen hidroksisinamik asit türevlerinin varlığını, hidroliz ile miktar artışı ve serbest fenolik madde açığa çıktığını göstermektedir. Örnekteki klorojenik asit miktarının asidik hidroliz sonrası azalması bu sonucu desteklemektedir. Klorojenik asidin çözücü ekstraktlarındaki değeri $2,63\pm0,21$ - $8,75\pm0,11$ mg/kg örnek; asidik hidroliz sonrası değeri ise $3,61\pm0,21$ - $4,92\pm0,21$ mg/kg örnek dur. Kuersetin miktarının her iki türde de asidik hidroliz sonrası arttığı rutin miktarının ise azaldığı gözlenmiştir. *S.domestica* türü için kuersetin miktarı hidroliz öncesi; $0,02\pm0,01$ - $0,54\pm0,03$ mg/kg örnek, hidroliz sonrası; $1,05\pm0,03$ - $38,35\pm0,96$ mg/kg örnek değerinde bulunmuştur. *S.torminalis* türünde ise kuersetin miktarı hidroliz öncesi; $0,10\pm0,01$ - $0,90\pm0,03$ mg/kg örnek, hidroliz sonrası; $0,21\pm0,02$ - $7,83\pm0,36$ mg/kg örnek değerindedir. *S. domestica* L. türü için artan kuersetin miktarı kaynağının rutin

olduğu düşünülürken *S. torminalis* L. türünde ise isokuersetin varlığı hidroliz sonrası kuersetin miktarını arttırmaktadır. Kuersetin glikoziti olan rutin ve isokuersetin kuvvetli asidik ortam hidroliz olarak aglikonu olan kuersetine dönüşmektedir. Bu nedenle kuersetin miktarları asidik hidroliz sonrası artmaktadır. *S. torminalis* L. türünde çözücü ekstraktlarında tayin edilen kamferol glikozit miktarı asidik hidroliz ile azalırken buna karşılık kamferol miktarının arttığı gözlenmiştir. Literatürde *Sorbus* L. türleri için tayin edilen fenolik maddeler ve miktarları farklılık göstermektedir (Olszewska 2008, Termentzi ve ark. 2008, Termentzi ve ark. 2009, Olszewska ve Roj 2011, Li ve ark. 2012). Bu farklılık bitkinin toplandığı farklı bölge veya konum, farklı tür, uygulanan farklı analitik ve ekstraksiyon yöntemlerinden kaynaklanabileceği söylenebilir (Imeh ve Khokhar 2002).

5.1.2. *Prunus* L. türlerinde bulunan fenolik maddelerin HPLC-DAD sonuçları

Prunus spinosa L. türünün ekstraksiyonunda klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit, rutin, kamferol glikozit, isokuersetin, kamferol, kuersetin, mirisetin, siyanidin, delfinidin, siyanidin glikozit ve siyanidin rutinosit tayin edilmiştir. *Prunus spinosa* L. türünde bulunan fenolik maddelerin miktarları Çizelge 4.1.3.1 verilmiştir. p-kumarik asit *P. spinosa* L. türünde en yüksek miktarda tayin edilen fenolik maddedir ve çözücü ekstraksiyonunda $9,39 \pm 0,21$ - $68,85 \pm 1,89$, asidik hidrolizde ise $34,44 \pm 0,43$ - $350,89 \pm 8,76$ arasında değişen değerlere sahiptir. Literatüre bakıldığında ise *P. spinosa* L. türü için tayin edilen fenolik madde türleri ve değerleri yapılmış çalışmalardan farklılık göstermektedir. Aynı zamanda literatüre göre *P. spinosa* L. türünde tayin edilen gallik asit (Ruiz-Rodríguez ve ark. 2013) çalışmamızdaki hiçbir ekstraktta tayin edilememiştir. Kafeik asit, kuersetin ve mirisetin değerleri su, etanol ve %50 su-etanol (v/v) ekstrakt değerleri ile karşılaştırıldığında daha önce yapılan çalışmalardan çok daha yüksek bulunmuştur (Ruiz-Rodríguez ve ark. 2014). Ayrıca *P. spinosa* L. türü için literatürde tayin edilen antosiyanidinler siyanidin-3-O-glikozit, siyanidin-3-O-rutinosit ve peonidin-3-O-glikozit olduğu belirtilmektedir (Ruiz-Rodríguez ve ark. 2014, Jang ve ark. 2016). Yaptığımız çalışmada ise siyanidin-3-O-glikozit ($11,30 \pm 0,03$ - $62,58 \pm 21$ mg/kg örnek), siyanidin-3-O-rutinosit ($82,10 \pm 5,69$ - $206,91 \pm 11,22$ mg/kg örnek), siyanidin ($21,05 \pm 1,53$ - $83,56 \pm 5,63$ mg/kg örnek) ve delphinidin ($35,90 \pm 1,11$ - $131,45 \pm 10,53$ mg/kg örnek) tayin ettiğimiz antosiyaninlerdir ve önceki çalışmalardan

daha yüksek değerler gözlenmiştir (Ruiz-Rodríguez ve ark. 2014, Jang ve ark. 2016). Bu farklılığın yetiştiği yörenin çevre koşulları, özellikle toprak niteliğinin ve olgunluk düzeyinin farklı olması ve ayrıca uygulanan ekstraksiyon ve analiz metotlarının farklılıklarından kaynaklandığı söylenebilir. *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* L. türünde bulunan fenolik maddelerin miktarları Çizelge 4.1.4.1. de verilmiştir. Klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit, rutin, kamferol glikozit, isokuersetin, kamferol, kuersetin, mirisetin tayin edilen fenolik maddelerdir. *P. spinosa* L. türüyle karşılaştırıldığında ise miktarsal olarak daha düşük fenolik madde içerdiği görülmektedir. Ayrıca *P. spinosa* L. türünde antosiyanin ve antosiyanidin tayin edilmemiştir. Çizelge 4.1.3.1 ve Çizelge 4.1.3.2.'de görüldüğü gibi klorojenik asit miktarı asidik hidroliz sonrası azalırken kafeik asit, ferulik asit ve p-kumarik asit miktarlarında artışlar gözlenmiştir. Aynı şekilde kuersetin, isokuersetin ve kamferol miktarında da asidik hidroliz sonrası artış gözlenirken, rutin ve kamferol glikozit miktarlarında ise azalma gözlenmiştir. Bu sonuç kuersetin glikoziti olan rutin ve kamferol glikozitin kuvvetli asidik ortam hidroliz olarak aglikonu olan kuersetin ve kamferole dönüştüğünü göstermektedir.

5.1.3. *Diospyros lotus* L. türünde bulunan fenolik maddelerin HPLC-DAD sonuçları

Diospyros lotus L. türünde bulunan fenolik maddelerin miktarları Çizelge 4.1.5.1'de verilmiştir. Gallik asit, kafeik asit, rosmarinik asit, ellagik asit, klorojenik asit tayin edilen fenolik asitlerdir. Rutin, kamferol glikozit, isokuersetin, kuersetin, kamferol ve mirisetin ise tayin edilen flavonoidlerdir. *D. lotus* L. için tayin edilen fenolik madde türü ve miktarı literatürde yapılmış çalışmalardan farklılık göstermektedir (Ayaz ve Kadioğlu 1997, Gao ve ark. 2014). Gallik asit için karşılaştırıldığında su ekstraktı (138,88±9,43 mg/kg örnek) daha yüksek iken metanol ekstraktında (174,52±12,34 mg/kg örnek) daha düşük gallik asit bulunmuştur. Rutin, su ve metanol ekstraktında tayin edilmezken bizim çalışmamızda yüksek miktarda (75,45±2,34 mg/kg örnek) tayin edilmiştir (Gao ve ark. 2014). Ayrıca literatüre göre *D. lotus* L. türünde tayin edilen mirisetin (Gao ve ark. 2014) çalışmamızdaki çözücü ekstraktında tayin edilememiştir. *D. lotus* L. için tayin edilen kuersetin değeri (11,42±0,87 mg/kg örnek) ise daha önce yapılan çalışmalardan daha yüksek bulunmuştur (Gao ve ark. 2014). Bu farklılığın meyvenin toplandığı lokalitenin,

uygulanan ekstraksiyon ve analiz metotlarının farklılıklarından kaynaklandığı söylenebilir (Imeh ve Khokhar 2002). Ayrıca meyve içerisinde tayin edilemeyen hidroksisinamik asit ve hidroksibenzoik asit türevleri de bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlardan bu türün zengin fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Fenolik madde miktarlarının çözücü ekstraktları ile asidik hidroliz sonrası değişimleri gözlenmektedir. Gallik asit, rosmarinik asit, ellagik asit, klorojenik asit, kuersetin, mirisetin ve kamferol miktarları asidik hidroliz ile artmaktadır. Buna karşın rutin, isokuersetin ve kamferol glikozit miktarlarında azalma gözlenmektedir. Asidik hidroliz ile glikozit yapılarının parçalanarak fenolik maddelerin serbest hale geçtiğini göstermektedir. Gallik asit ve ellagik asit miktarındaki artış yapıda tayin edilemeyen ellagik asit türevinin; rosmarinik asit ve klorojenik asit miktarındaki artış ise tayin edilemeyen hidroksisinamik asit türevinin olduğunu göstermektedir (Dai ve Mumper 2010). Kuersetin miktarındaki artış ise bu maddenin glikozit yapıları olan rutin ve isokuersetin hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Kamferol glikozitin hidrolizi ile de kamferol miktarında artış gözlenmektedir.

5.1.4. Ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin etkisi

Çözücü ekstraksiyonu bitkilerde bulunan flavonoid ve fenolik asitler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fenolik bileşikler genellikle polar özellik gösterdiklerinden ekstraksiyon metodunda en çok kullanılan çözücüler su, metanol, etil asetat, aseton ve bunların farklı asitli veya asitsiz karışımlarıdır. Bitkilerde bulunan fenolik maddelerin ekstraksiyon verimleri, bu fenolik maddelerin kullanılan çözücülerdeki çözünürlüğüne bağlıdır. Bu nedenle fenolik maddelerin ekstraksiyonu için standart bir metot yoktur. (Dai ve Mumper 2010). Ayrıca asidik hidroliz metodunda glikozit bağları parçalandığı için serbest fenolik maddelerde açığa çıkmaktadır. Yabani meyve türlerinde bulunan fenolik maddelerin ekstraksiyon işlemi sırasında su, metanol, etanol, %50 su-metanol (v/v), %50 su-etanol (v/v) ve bunların asidik karışımları kullanılmıştır. Su, metanol ve etanol için bilinen polarite indeksleri sırasıyla 9,0, 6,6 ve 5,2 dir. Fenolik maddelerin ekstraksiyonu için çözücülerin etkisi karşılaştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında ve literatür bilgisi gözönüne alındığında (Dai ve Mumper 2010) çözücü polaritesinin fenolik maddelerin ekstraksiyon verimi üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Ekstraksiyon işleminde metanol kullanıldığında yüksek miktarlarda fenolik maddelerin

ekstrakte edildiği görülmektedir. Alkol ile hazırlanan ekstraktların su ile hazırlanan ekstraktlardan daha yüksek miktarda polifenol içerdiği bilinmektedir. Bu durum alkollerin bitki hücre duvarlarından polifenollerin daha kolay ayrılmasının sağlandığı ile açıklanmaktadır (Tiwari ve ark. 2011). Ayrıca düşük molekül ağırlıklı polifenollerin (flavonlar, polifenoller, antosiyaninler) ekstraksiyonunda metanolün genel olarak daha verimli olduğu bulunmuştur (Dai ve Mumper 2010, Tiwari ve ark. 2011). Toplam fenol içeriğine bakılınca asidik hidrolizin genel olarak çözgen ekstraksiyonuna göre daha yüksek fenol içerdiği anlaşılmaktadır. Fenolik madde miktarlarına bakılınca metanol asit, asidik hidroliz metodu için en uygun çözücüdür. Ekstraksiyon teknikleri açısından değerlendirildiğinde ise ultrasonik ekstraksiyonun tüm yabani meyve türleri için çözücü ekstraksiyonundan daha verimli olduğu görülmektedir. Ultrasonik ekstraksiyon sistemi ucuz, hızlı, basit ve verimli olması nedeniyle klasik ekstraksiyon tekniklerine iyi bir alternatif olmaktadır.

5.1.5. Analitik yöntem geçerliliği (validasyonu)

Yabani meyve türlerindeki fenolik bileşiklerin derişimlerinin tayinlerinde analitik parametreler açısından uygulanan metodun geçerliliğinde, mevcut fenolik bileşiklere ait LOD (3s/m), LOQ (10s/m) ve % geri kazanım değerleri (Çizelge 4.1.6.1) sırasıyla 0,1-0,28 mg/L ve LOQ 0,32-0,86 mg/L aralığında değişmektedir. Fenolik bileşiklerin ortalama geri kazanım değerleri; ekstraksiyon metodu için %82±2 (rutin)-102±3 (gallik asit) ve asidik hidroliz metodu için %71±1 (rutin)-103±2 (ferulik asit) bulunmuştur. Yabani meyve türlerinde ekstraksiyon metodu için en düşük geri kazanım değeri %82±2 rutine ait iken asidik hidroliz metodu için de %71±1 ve %73±4 kamferol glikozite aittir. Rutin ve kamferol glikozidik yapıda olduğu için asidik hidroliz metodunda yapısı parçalanmaktadır. Bu nedenle asidik hidroliz metodu için bulunan geri kazanım değeri ekstraksiyon metodu için bulunan geri kazanım değerinden küçüktür. Bununla birlikte flavonoid ekstraksiyonu için en uygun metot asidik hidrolizdir [%71±1 (rutin), %73±4 (kamferol glikozit), %76±1 (siyanidin glikozit), %77±2 (siyanidin rutinosit)] . Yabani meyve türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları hesaplanırken geri kazanım değerleri dikkate alınmıştır.

5.2. Spektroskopik Yöntemler

5.2.1. Toplam fenol ve toplam flavonoid tayin sonuçları

Bu çalışmada; *Sorbus domestica* L., *Sorbus torminalis* L., *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata*, *Prunus spinosa* L., ve *Diospyros lotus* L. türlerinin farklı polaritedeki çözgen ekstraktlarının toplam fenol ile toplam flavonoid sonuçları elde edilmiştir ve farklı ekstraksiyon teknikleri karşılaştırılmıştır. Hazırlanan ekstraktların toplam fenol ve toplam flavonoid değerleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.2.1.1-4.2.2.5) en yüksek değerlerin metanol ekstraktında bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, yabani meyve türlerinin içerdiği fenolik bileşiklerin metanol ile daha fazla çözünerek ekstrakte edilebildiğini ve ekstrakte edilen fenoliklerin uygulanan tayin metodunda ölçülebildiği ile açıklanabilir. Toplam fenol değerleri çözücü ekstraksiyonları için 11-83 mg gallik asit/100g örnek, asidik hidroliz için 18-116 mg gallik asit/100g örnek olarak değişim göstermektedir (Şekil 4.2.1.1-4.2.1.5). *Prunus* L. türleri içerisinde *P. spinosa* L. türü *P. divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* türüne göre daha yüksek toplam fenol ve toplam flavonoid değerine sahiptir. *Sorbus* L. türlerinin toplam fenol değerleri ve toplam flavonoid değerleri arasında ise çok büyük farklar görülmemiştir. *S. domestica* L. türünde toplam fenol değeri 14,35-58,07 mg gallik asit/100 g örnek, toplam flavonoid değeri ise 3,68-59,88 mg (+) kateşin/100 g örnek aralığında değişim göstermektedir. *S. torminalis* L. türünde ise bu değerler toplam fenol için 13,03-93,26 mg gallik asit/100 g örnek toplam flavonoid için ise 3,03-88,56 mg (+) kateşin/100 g örnek dir. Toplam flavonoid miktarı yabani meyve türlerinde çözücü ekstraksiyonları için 10,44-1119,73 mg (+) kateşin/100 g örnek, asidik hidroliz için 21,66-149,02 mg (+) kateşin/100 g örnek aralığında bulunmuştur. Yabani meyve türleri için asidik hidroliz ile yapılan çözücü ekstraktlarının toplam fenol ve toplam flavonoid değerleri hidroliz edilmeden elde edilen çözücü ekstraktları değerlerinden yüksek bulunmuştur. Bu da meyvenin yapısında bulunan flavonoid glikozitlerinin asidik hidroliz ile serbest hale geçtiği, toplam fenol ve toplam flavonoid değerlerinin hem serbest halde bulunan hem de glikozitlerin hidrolizinden gelen fenolik maddelerden kaynaklandığı sonucunu ortaya çıkarmıştır. *S. torminalis* L., *D. lotus* L. ve *P. spinosa* L. için tayin edilen toplam fenol ve toplam flavonoid miktarı literatürde belirtilen değerlerden daha düşüktür (Ebrahimzadeh ve ark. 2008, Ewa Jabłońska-Ryś ve ark. 2009, Gao ve ark. 2014, Ruiz-Rodríguez ve ark. 2014, Veličković

verak. 2014, Hasbal ve ark. 2015). *S. torminalis* L. için toplam fenol değeri $13,03 \pm 0,71 - 93,26 \pm 4,53$ mg gallik asit/100 g örnek ($20,44 \pm 0,910$ mg gallik asit/g örnek), toplam flavonoid değeri $3,03 \pm 0,11 - 88,56 \pm 1,23$ mg (+) kateşin/100 g örnek ($12,19 \pm 2,005$ mg kateşin/g örnek), *D. lotus* L. için toplam fenol değeri $5,90 \pm 0,10 - 43,05 \pm 1,21$ mg gallik asit/100 g örnek ($10,50 \pm 0,02$ mg gallik asit/g kuru örnek), toplam flavonoid değeri $7,21 \pm 0,31 - 80,81 \pm 2,14$ mg (+) kateşin/100 g örnek ($2,03 \pm 0,01$ mg kuersetin/g kuru örnek), *P. spinosa* L. için toplam fenol değeri $19,76 \pm 1,01 - 116,14 \pm 5,23$ mg gallik asit/100 g örnek ($402,67 \pm 12,44$ mg gallik asit/100 g örnek), toplam flavonoid değeri $30,73 \pm 1,03 - 149,02 \pm 7,21$ mg (+) kateşin/100 g örnek ($1,31 \pm 0,17$ mg kuersetin/g örnek) olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon metotlarının, meyvenin yetiştiği çevre (ışık, sıcaklık ve toprakta bulunan mineraller gibi) ve iklim koşulları farklılığı bitkinin miktarsal içeriğinde etkili olabileceği söylenmektedir (Imeh ve Khokhar 2002). Elde edilen toplam flavonoid sonuçlarına bakıldığında, yabani meyve yapılarında flavonoid aglikonlarının glikozitlerine oranla daha fazla olabileceği de öngörülebilmektedir. Yabani meyvelerde flavonoidler genellikle glikozitleri olarak bulunur ve uygulanan asitli ekstraksiyon metoduyla aglikonlarına hidrolizlenebilir. Flavonoid aglikonlarının da metanolde daha fazla çözündüğü belirtilmektedir (Hertog ve ark. 1992). Elde edilen sonuçlara göre ekstraksiyon metotlarının toplam flavonoid içeriği değerlendirildiğinde metanol ekstraktının diğer ekstraktlardan daha yüksek miktarda olduğu görülmektedir (Şekil 4.6.2.1-4.6.2.5). Yabani meyve türlerinde bulunan glikozit yapılarının uygulanan asitli ekstraksiyon metoduyla aglikonlarına hidrolizlenebildiği dolayısıyla metanol de daha fazla ekstrakte edilebildikleri sonucuna varılmaktadır. Ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırıldığında ise ultrasonik ekstraksiyonun tüm yabani meyve türleri için çözücü ekstraksiyonundan daha verimli olduğu gözlenmektedir.

5.2.2. Antioksidan kapasite tayin sonuçları

Sorbus domestica L., *Sorbus torminalis* L., *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata*, *Prunus spinosa* L., ve *Diospyros lotus* L. türlerinin meyveleri, ABTS, CUPRAC ve CHROMAC metotları uygulanarak tayin edilen antioksidan kapasite değerleri troloks eşdeğerinde ($\mu\text{mol troloks/g}$ örnek) hesaplanmıştır ve bulunan değerler Çizelge 4.2.3.1-Çizelge 4.2.3.5'de verilmiştir. *Prunus spinosa* L. türünde ABTS metodu ile tayin edilen antioksidan kapasite değeri çözücü ekstraktında $3,04 \pm 0,21 - 18,77 \pm 1,11$ $\mu\text{mol troloks/g}$

örnek, ultrasonik ekstraktında $6,35 \pm 0,55$ - $22,09 \pm 1,23$ aralığında değişim göstermektedir. *Prunus spinosa* L. için tayin edilen toplam fenol ve toplam flavanoid değerlerinin de yüksek olması antioksidan kapasite değerinin de yüksek olabileceğini işaret etmektedir. Çünkü literatürde de belirtildiği (Jabłońska-Ryś ve ark. 2009, Loizzo ve ark. 2009, Gao ve ark. 2014, Bhatt ve ark. 2017) gibi toplam fenol ve/veya toplam flavonoid ile antioksidan kapasite arasında yüksek pozitif korelasyon olduğu görülmektedir. Literatürde ABTS metodu için tayin edilen antioksidan kapasite değerlerinin $5,33 \pm 0,22$ $\mu\text{M TE/g fw}$ (Jabłońska-Ryś ve ark. 2009), $7,64 \pm 0,74$ mmol Trolox/100 g fw (Ruiz-Rodríguez ve ark. 2013), DPPH metodu için ise $1,39 \pm 0,08$ mmol of Trolox/ 100 g fw (Ruiz-Rodríguez ve ark. 2013) olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda ise *Prunus divaricata* Ledeb.sups. *divaricata* türü için $1,02 \pm 0,05$ - $12,80 \pm 0,81$ $\mu\text{mol trolox/ g örnek}$ bulunmuşken DPPH metodu ile $21,25 \pm 1,54$ (%) değeri bulunduğu belirtilmiştir (Motamed ve Naghibi 2010). Yapılan başka bir çalışmada ise ABTS ve DPPH metotları arasında yüksek pozitif korelasyon olduğu da bulunmuştur (Hasbal ve ark. 2015). Literatür çalışmaları ve elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde uygulanan bir tek bir metodunun tayin edilen materyalin antioksidan kapasite değerini tam olarak yansıttığı söylenemez. Metotlar; ölçüm prensipleri, deneysel koşullar ve reaksiyon verebildikleri fenolik madde gruplarına göre değişim göstermektedirler. Dolayısıyla antioksidan kapasitesi tayin edilmek istenen materyalin tek bir metotla değil en az iki metotla kapasite değerinin belirlenmesi tahmin edilen değer için daha doğru sonuç verebilir (Huang ve ark. 2005, Prior ve ark. 2005). Elektron transfer yöntemine dayanan ABTS, DPPH, CUPRAC ve CHROMAC antioksidan kapasite tayin metotlarının aynı materyal üzerinde istatistiksel olarak uyumlu sonuçlar verebildikleri ve aralarında pozitif korelasyon olduğu görülmektedir (Işık ve ark. 2013, Hasbal ve ark. 2015). *S. domestica* L. ve *S. torminalis* L. türlerinin meyvelerindeki antioksidan kapasite değerleri karşılaştırıldığında *S. torminalis* L. türünün daha yüksek antioksidan kapasite değerine sahip olduğu Çizelge 4.2.3.1 ve Çizelge 4.2.3.2’de görülmektedir. Bu sonuç tayin edilen fenolik madde, toplam fenol ve toplam flavonoid içerikleri açısından değerlendirildiğinde daha yüksek antioksidan kapasite değerine sahip olabileceğini göstermektedir. *S. domestica* L. türünün antioksidan kapasite değeri ABTS metodu için $1,08 \pm 0,09$ - $5,87 \pm 0,45$ $\mu\text{mol trolox/ g örnek}$, CUPRAC metodu için $1,04 \pm 0,08$ - $5,90 \pm 0,44$ $\mu\text{mol trolox/ g örnek}$ ve CHROMAC metodu için ise $0,98 \pm 0,04$ - $5,81 \pm 0,32$

aralığında değişim göstermektedir. *Sorbus domestica* L. ile yapılan çalışmada DPPH metodu uygulanmış ve 6.29 ± 0.20 mg antioxidant/mg DPPH• antioksidan kapasite değerine sahip olduğu bulunmuştur (Termentzi ve ark. 2006). *Sorbus torminalis* L. türünün antioksidan kapasite değeri ise $1,14 \pm 0,10$ - $4,66 \pm 0,34$ mol troloks/ g örnek aralığında değişim göstermektedir. Literatürle karşılaştırıldığında ise farklı çözücülerde ABTS metodu ile 1.37 ± 0.051 mM ve 0.50 ± 0.084 mM, DPPH metodu ile 0.85 ± 0.019 mM, 0.19 ± 0.052 mM olduğu bulunmuştur (Hasbal ve ark. 2015). *Diospyros lotus* L. türünün tayin edilen antioksidan kapasite değerleri izelge 4.2.3.5’de verilmektedir ve bu değerler literatür ile farklılık göstermektedir. ABTS metodu ile yapılan çalışmada *Diospyros lotus* L. türü için antioksidan kapasite değeri TEAC birimiyle $0,36 \pm 0,01$ bulunurken DPPH metodu uygulandığında $72,6 \pm 1,5$ IC50 g/mL (Loizzo ve ark. 2009), $86,3 \pm 0,99$ g/mL ve $201,0 \pm 1,02$ g/mL olarak bulunmuştur (Gao ve ark. 2014). Bu sonuçlar çalışılan çeşitlerin farklı zamanlarda hasat edilmesi, yetiştirilen bölgenin iklimsel değişikliklerinin sebep olduğu miktarsal farklılıklar, ekstraksiyon metotlarının ve kullanılan standartların farklılığı ile açıklanmaktadır (Imeh and Khokhar 2002). Literatürde yabani meyve türlerinde ABTS DPPH ve FRAP metotları ile yapılan çalışmalar mevcut iken CUPRAC ya da CHROMAC metodu ile yapılan antioksidan kapasite tayin çalışmalarına rastlanmamıştır (Termentzi ve ark. 2006, Loizzo ve ark. 2009, Gao ve ark. 2014, Hasbal ve ark. 2015). Ekstraksiyon zclerinin antioksidan kapasite değerleri karşılaştırıldığında, metanol ekstraktlarının su ekstraktlarından daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (izelge 4.2.3.1-4.2.3.5) Flavonoid glikozitlerin suda, hidrolizle serbest hale geçen ya da serbest halde bulunan aglikonların ise metanolde daha fazla çözündüğü literatürde belirtilmektedir (Hertog ve ark. 1992). Ayrıca glikozit yapıları sterik etki nedeniyle aglikon yapılarından daha düşük antioksidan kapasite değerine sahiptir. Çalışmada uygulanan asitli su ekstraksiyonunda flavonoid glikozitlerin bulunması ve hidrolizle serbest kalan aglikonların suda fazla ekstrakte edilememesi ölçülen kapasite değerinin düşük olmasına sebep olabilmektedir. Ekstraksiyon teknikleri açısından değerlendirildiğinde ise ultrasonik ekstraksiyonun tüm yabani meyve türleri için çözücü ekstraksiyonundan daha verimli olduğu gözlenmektedir. Ultrasonik ekstraksiyon sistemi; ucuz, hızlı, basit ve verimli olması nedeniyle klasik ekstraksiyon tekniklerine iyi bir alternatif olacaktır.

5.2.3. İstatistiksel analiz sonuçları

Sorbus domestica L., *Sorbus torminalis* L., *Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata*, *Prunus spinosa* L., ve *Diospyros lotus* L. türlerinin antioksidan kapasite değerlerinin belirlenmesinde uygulanan metotlar arasındaki ilişkiyi incelemek için korelasyon değerleri hesaplandı ve t testi uygulandı. *D. lotus* L. türü için ABTS, CUPRAC ve CHROMAC metotları arasındaki korelasyon değerleri Çizelge 5.2.3.1a, Çizelge 5.2.3.1b’de ve t testi sonuçları ise Çizelge 5.2.3.2a-5.2.3.2d’de verilmiştir.

Çizelge 5.2.3.1a. *Diospyros lotus* L. için ultrasonik ekstraktlarında antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasındaki ilişki

	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
ABTS	1		
CUPRAC	0,85	1,00	
CHROMAC	0,88	0,94	1,00

Çizelge 5.2.3.1b. *Diospyros lotus* L. için çözücü ekstraktlarında antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasındaki ilişki

	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
ABTS	1		
CUPRAC	0,69	1,00	
CHROMAC	0,82	0,54	1,00

Çizelge 5.2.3.2a. *Diospyros lotus* L. için ultrasonik ekstraktlarında ABTS ve CHROMAC antioksidan kapasite (µmol troloks/g örnek) metodları arasına uygulanan t testi sonuçları (%95)

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC	
	Ultrasonik ABTS	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	3,965291525	4,474262912
Varyans	0,77655671	1,080852124
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,883591257	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-3,296451932	
P(T<=t) tek-uçlu	0,004641147	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,009282294	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

Çizelge 5.2.3.2b. *Diospyros lotus L.* için çözücü ekstraktlarında ABTS ve CHROMAC antioksidan kapasite (μmol troloks/g örnek) metodları arasına uygulanan t testi sonuçları (%95)

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC	
	Çözücü ABTS	Çözücü CHROMAC
Ortalama	3,802904912	3,658101283
Varyans	0,411806524	0,49677659
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,821465724	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,12564424	
P(T<=t) tek-uçlu	0,144718337	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,289436674	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

Çizelge 5.2.3.2c. *Diospyros lotus L.* için ultrasonik ekstraktlarında CUPRAC ve CHROMAC antioksidan kapasite (μmol troloks/g örnek) metodları arasına uygulanan t testi sonuçları (%95)

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC	
	Ultrasonik CUPRAC	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	4,498437458	4,474262912
Varyans	1,353032574	1,080852124
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,935004929	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	0,184080503	
P(T<=t) tek-uçlu	0,42901555	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,858031099	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

Çizelge 5.2.3.2d. *Diospyros lotus L.* için ultrasonik ekstraktlarında CUPRAC ve CHROMAC antioksidan kapasite (μmol troloks/g örnek) metodları arasına uygulanan t testi sonuçları (%95)

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC	
	Çözücü CUPRAC	Çözücü CHROMAC
Ortalama	4,141	3,658101283
Varyans	1,748298889	0,49677659
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,544175975	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,376458318	
P(T<=t) tek-uçlu	0,100976808	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,201953617	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ABTS, CUPRAC ve CHROMAC metodları arasında yüksek korelasyon olduğu ve antioksidan kapasite sonuçları arasında fark olmadığı görülmektedir.

Türkiye çeşitli coğrafi özellikleri ve coğrafi farklılığın getirdiği iklim çeşitliliği nedeniyle dünyada benzerine az rastlanan bir bitki çeşitliliğine, 3 bini aşkın endemik, 10 bin civarında bitki türüne sahiptir. Doğal antioksidanların sağlık açısından daha yararlı olduğu düşüncesi tüketicilerin tercihini her geçen gün bu yöne daha çok çekmektedir. Yeryüzünde geniş dağılım gösteren ve doğal antioksidanlar bakımından zengin olan bitkilerden bu bileşiklerin besin olarak alınmasıyla fitokimyasalların sinerjist etkileri antioksidan aktiviteyi artırabilmekte ve sağlık açısından önemli derecede faydalı olmaktadır. Ayrıca antioksidan maddelerin ekstrakte edilerek gıda katkı maddesi ya da koruyucu olarak kullanılması gittikçe önem kazanan bir konu haline gelmiştir. Yaşam kalitesini arttıran ve/veya iyileştiren ürünlerin sektöre katkısı olacağı açıktır. Bu kapsamda yaşam kalitesini artıran doğal ürünlerin içeriğinin ve çeşitli hastalıklara karşı kullanılabilirliğinin araştırılması önem kazanmaktadır. Bu bağlamda da yeni araştırmalara temel oluşturabilecek bir çalışmadır.

Antioksidanların çok ve çeşitli oluşu, sebze ve meyve matrikslerinden ayrılma ve bireysel kantitatif tayinlerini güçleştirmektedir. Ayrıca antioksidanların eşgüdüm içinde

davranarak birbirlerinin etkisini arttırmaları da söz konusudur. Bu nedenle, toplam antioksidan düzeyini doğrudan bitkisel ekstraktlarda ve biyolojik sıvılarda ölçebilecek güvenilir metotlara ihtiyaç vardır.

Tez kapsamında gıda, sağlık ve çevre alanlarında kullanılan ürünlerin toplam antioksidan düzeylerini belirlemek için Cr (VI) antioksidan kapasite (CHROMAC) metodu geliştirilmiştir (Işık ve ark. 2013). Bu metot hidrofilik ve lipofilik maddelerin antioksidan özelliğini doğrudan ölçmek için duyarlı bir metottur. CHROMAC metodu, flavonoid glikozitlerin hidroliz olduğu asidik ortam ve antioksidan maddelerin sindirim sisteminde bulunduğu şartlarda antioksidan kapasite tayinini sağlar. Metodun uygulanması diğer metotlara göre daha kısadır ve maliyeti düşüktür, aynı zamanda literatürde yaygın olarak kullanılan antioksidan kapasite metotlarına da alternatif olabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Ahmet, F.A., Kadioglu, A. 1998.** Non volatile acid composition during fruit development of *Diospyros lotus* L. *Turkish Journal of Botany*, 22:69-72.
- Alañón, M.E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., Hermosín-Gutiérrez, I., Gordon M.H., Pérez-Coello, M.S. 2011.** Antioxidant capacity and phenolic composition of different woods used in cooperage. *Food Chemistry*, 129:1584-1590.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. 2000.** Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125:989–1009.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I. Özyurt, D. 2007.** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S.E. 2008.** Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta*, 160: 413–419.
- Aras, Ö. 2006.** Üzüm ve üzüm ürünlerinin toplam karbonhidrat, protein, mineral madde ve fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Arts, I.C., van de Putte, B., Hollman, P.C.H. 2000a.** Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, stable foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1746–1751.
- Arts, I.C., van de Putte, B., Hollman, P.C.H. 2000b.** Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:1752-1757.
- Ayaz, F.A., Kadioğlu, A., Hayırhoğlu, S. 1995.** Determination of some mono- and disaccharides in the fruits of *Diospyros lotus* L. using gas chromatography. *Turkish Journal of Botany*, 19:493–495.
- Aybastier, Ö. 2010.** Bitkisel atık yağların karakterizasyonu ve biyodizel üretiminde değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Bursa.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, Samir. 2006.** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191–203.
- Baytop, T. 1999.** Türkiye’de bitkilerle tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara
- Becker, EM., Nissen, LS., Skibsted, LH. 2004.** Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 10.107/s00217-004-1012-4.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay a measure of “Antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.

- Bhatt, I.D., Rawat, S., Badhani, A., Rawal, R.S. 2017.** Nutraceutical potential of selected wild edible fruits of the Indian Himalayan region. *Food Chemistry*, 215: 84-91.
- Castañed-Ovando, A., ma. de Lourdes Pacheco-Hernández, ma. Elena Pàez-Hernández, Rodriguez, J.A., Galàn-Vidal, C.A. 2009.** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859-871.
- Clifford, M. N., Scalbert, A. 2000.** Ellagitannins occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1118-25.
- Cooper-Driver, G. A. 2001.** Contributions of jeffrey harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, 56(3): 229-236.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. 2006.** Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford; Ames, Iowa: Blackwell Pub. Xii, p. 372.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berst, C. 1992.** Comparison of the antioxidative activity of some phenolic acids: Structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56: 324-325.
- da Costa, C. T., Nelson, B. C., Margolis, S. A., Horton, D. 1998.** Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2): 321-327.
- Dai, J., Mumper, R. J. 2010.** Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- Davis, P.H. 1972.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh at the Üniversity Press.
- de Heer, M. I., Korth, H. G., Mulder, P. 1999.** Polymethoxy phenols in solution: O-H bond dissociation enthalpies, structures and hydrogen bonding. *Journal of Organic Chemistry*, 64: 6969-6975.
- Demirkıran, Ö. 2005.** Hypericum Montbretı Spach. bitkisindeki fenolik bileşiklerin izolasyonu ve tanımlanması. *Doktora Tezi*, TÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Demiray, E., Tülek, Y. 2008.** Domates kurutma teknolojisi ve kurutma işleminin domatesteki bazı antioksidan bileşiklere etkisi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3: 9-20.
- Demirezer, Ö. (Ed.) 2007.** Tedavide kullanılan bitkiler. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Dey, P. M. ve Harborne, J. B. 1989.** 1. Plant phenolics methods in plant biochemistry (2nd printing). London: Academic Press Limited. pp. 326-341.
- Ekim, T. 2007.** Türkiye'nin nadir ve endemik bitkileri. Türkiye İş Bankası yayınları, İstanbul.
- Elovitz, M.S., Fish, W. 1995.** Redox interactions of Cr(VI) and substituted phenols: products and mechanism. *Environmental Science & Technology*, 29: 1933-1943.
- Ellefson, W., Lilla Z., Crowley, R. 2006.** Quantification and evaluation of antioxidants in food and botanical products. International Conference on Nutraceuticals and Functional Foods, November 5-8, Reno, Nevada.

- Espin, J.C., Garcia-Conesa, M.T., Tomas-Barberan, F.A. 2007.** Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, 68 (22-24): 2986-3008.
- Frankel, EN., Meyer, AS. 2000.** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925-1941.
- Fleschlhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S. E. 2006.** Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 45(1): 7–18.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G. 2000.** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597-3604.
- Gökşin, A. 1983.** Türkiye’de Doğal olarak Yetişen Üvez (Sorbus L.) Taksonlarının Yayılışları İle Önemli Bazı Morfolojik ve Anatomik Özellikleri Üzerine Araştırmalar. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten, Seri No: 120, 84 s, Ankara.
- Güçlü, K., Altun M., Özyürek, M., Karademir, S. E., Apak, A. 2006.** Antioxidant capacity of fresh, sun and sulphited-dried malatya apricot (*Prunus armeniaca*) assay by CUPRAC, ABTS/TEAC and folin methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 76-85.
- Gündüz, T.1985.** Yarı-Mikro Kalitatif Analiz, Ankara.
- Güner, A. 2012.** Türkiye bitkileri listesi (Damarlı Bitkiler). ANG Vakfı, İstanbul.
- Hakkinen, S., Heironen, M., Karenlampi, S., Mykkanen, H., Ruuskanen, J. and Törrönen, R. 1999.** Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32: 345-353.
- Harborne, J. B. 1965.** Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochemistry*, 4, 107-120.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. 2000.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- Hasbal, G., Özden, T.Y., Can, A. 2015.** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz (wild service tree) fruits, *Journal of Food and Drug Analysis*, 23: 57-62.
- Henning, W., Herrmann, K. 1980.** Flavonol glycosides of plums of the species *Prunus domestica* L. and *Prunus salicina* Lindley. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und Forschung*, A, 171: 111–118.
- Hertog, M.G. L., Hollman, P.C.H., Venema, D.P. 1992.** Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1591–1598.
- Hertog, M.G.L. 1994.** Flavonols and flavones in foods and their relation with cancer and coronary heart disease. Thesis, Agricultural University Wageningen, State Institute for Quality Control of Agricultural Products, The Netherlands, and National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands. Wageningen, The Netherlands.
- Huang, D., Ou B., Prior, R. 2005.** The chemistry behind antioxidant capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.

- Hukkanen, A.T., Pölönen, S.S., Kärenlampi, S.O., Kokko, H.I. 2006.** Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 112–119.
- Gao, H., Cheng, N., Zhou, J., Wang, B.N., Deng, J.J., Cao, W. 2014.** Antioxidant activities and phenolic compounds of date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruits *Journal of Food Science and Technology*, 51(5):950–956.
- Imeh, U., Khokhar, S. 2002.** Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22):6301–6306.
- Iriti, M., Faoro, F. 2006.** Grape phytochemicals: A Bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Medical Hypotheses*, 67(4): 833-838.
- Işık, E., Şahin, S. Demir, C. 2013.** Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111 (2013) 119–124.
- Jabłońska-Ryś, E., Korona, M.Z., Kalbarczyk, J. 2009.** Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17/(2): 115-120.
- Jang, G. H., Kim H.W., Lee, M.K., Jeong, S.Y., Bak, A. R., Lee, D.J., Kim, J.B. 2016.** Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the *Prunus* genus by UPLC-DAD-QTOF/MS. *Saudi Journal of Biological Sciences*, doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.08.001.
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S., Cabaroğlu, T., 2006.** Bazı üzüksü meyvelerde toplam fenol ve antosiyanin içerikleri. II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 309-312.
- Kapasakalidis, P.G., Rastall, R. A., Gordon, M. H. 2009.** Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4342–4351.
- Karakaya, S., Nehir El, S. 2006.** Bazı bitkisel çayların toplam fenolik madde içerikleri, antioksidan aktiviteleri ve siyah çay polifenollerinin in vitro biyoyararlılığı. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23 (1): 1-8.
- Kaynak, G., Daşkın, R., Yılmaz, Ö. 2005.** Bursa Bitkileri, Uludağ Üniversitesi, Kent Tarihi ve Araştırma Merkezi Yayını 2, Bursa.
- Ketenoglu O., Obalı O., Kurt L., Güney K., Tuğ GN., Geven F., Bingöl Ü., Körüklü T. 2011.** Ekonomik Bitkiler. Palme Yayıncılık.
- Konczak, I. ve Zhang, W. 2004.** Anthocyanins-more than naturés colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5): 239-240.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. 2003.** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5): 923–933.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Auriola, S., Kontkanen, H., Buchert, J., Poutanen, K. S., Törrönen, A. R. 2008.** Characterization and fate of black currant and bilberry flavonols in enzyme-aided processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3136–3144.

- Kosuge, S., Furuta., M. 1970.** Studies on the pungent principle of capsicum. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34: 248-256.
- KotasÂ, J., Stasicka, Z. 2000.** Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, 107: 263-283.
- Kris-Etherton, P.M., K.D. Hecker, A. Bonanome, S.M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel., T.D. Etherton. 2002.** Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113 (Suppl 9B): 71-88.
- Krygier, K., Sosulski, F., Hogge, L. 1982.** Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 2. Composition of phenolic acids in rapeseed flour and hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 334-336.
- Kuninori, T., Nishiyama, J. 1986.** Separation and quantitation of ferulic acid and tyrosine in wheat seeds (*Triticum Aestivum*) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 362:255-262.
- Lee, H.S, Widmer, B.W. 1996.** Phenolic compounds. In: Nollet LML, ed. Handbook of food analysis. Physical characterization and nutrient analysis. New York, USA: Marcel Dekker, Inc. Vol 1, s.821-894.
- Li, H., Pordesimo, L., Weiss, J. 2004.** High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37: 731-738.
- Lichtenthaler, R., Marx, F., Kind, O.M. 2003.** Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. *European Food Research and Technology*, 216: 166-173.
- Liggins, J., Bluck, L.J.C. 1998.** Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Analytical Biochemistry*, 264:1-7.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J., Liu, R. H. 2002.** Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 2926-2930.
- Luque-García, JL, Luque de Castro, MD. 2004.** Ultrasound-assisted soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034 (1-2) :237-242.
- Lust, J. 1980.** The herb book. New York: Bantam.
- Määttä-Riihinen, K.R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P.H., Gonzalez-Paramas, A.M., Törrenen, A.R. 2004.** Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14): 4477-4486.
- Monica Rosa Loizzo, M.R., Said, A., Tundis, R., W. Hawas, U., Rashed, K., Federica Menichini, F. Frega, N.G., Menichini, F. 2009.** Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds, *Plant Foods for Human Nutrition*, 64:264-270.

- MacDonald-Wicks, L.K., Wood L.G., Garg, M.L. 2006.** Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 2046-2056.
- MacDougall, D.B. 2002.** Colour in food improving qality. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, 179-221.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.
- Mason, T.J. 1998.** Power ultrasound in food processing. The way forward. In: ultrasound in food processing. MJW Povey and TJ Mason (eds), pp.105-126, Chapman & Hall, London.
- Mazza, G. ve Miniati, E. 1993.** Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC Pres, London, UK.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A. 1994.** Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymology*, 234:279–293.
- Miller, N.J., Sampson, J. Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A. 1996.** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384:240–242.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A., Scaccini, C. 2002.** Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79: 119-124.
- Nichenametla, S.N., Taruscio, S.N., Barney, D.L., Exon, J.H. 2006.** A Review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 46(2): 161-183.
- Nizamhoğlu, N.M., Nas, S. 2010.** Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Electronic Journal of Food Technologies*, 5: 20-35.
- Nürnbergger, H. 1964.** Zur Verbreitung der flavonole in den blättern und fruchten der gattung Sorbus. *Flora*, 155: 598–602.
- Olszewska, M. 2008.** Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three Sorbus species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(3): 629–635.
- Olszewska, M. 2009.** Flavonoid profile of Sorbus intermedia. *Chemistry of Natural Compounds*, 45 (5): 722-724.
- Olszewska, M. A., Roj, J.M. 2011.** Phenolic constituents of the inflorescences of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. *Phytochemistry Letters*, 4: 151–157.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Prior, R.L., Huang, D. 2002.** Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2772-2777.
- Özhatay, N., Byfield, A., Atay, S. 2005.** Türkiye'nin 122 Önemli bitki alanı. WWF Türkiye, İstanbul.

- Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, A. 2011.** The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry*, 30: 652-664.
- Pehlivan, M., Güleriyüz, M. 2004.** Ahududu ve Böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. *Bahçe*, 33 (1-2): 51 – 57.
- Perez-Serradilla, JA., Capote, P.F., Castro, LMD. 2007.** Simultaneous ultrasound-assisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples. *Analytical Chemistry*, 79: 6767-6774.
- Pflaumnd, BY R., Howick, L.C . 1956.** The chromium-diphenylcarbazide reaction. 78: 4862-4866.
- Price, J.A., Sanny, C.G., Shevlin, D. 2006.** Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of “total” antioxidant, activity of drugs and natural products. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54:56-61.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.
- Pyysalo, H., Kuusi, T. 1974.** Phenolic compounds from the berries of mountain ash, *Sorbus aucuparia*. *Journal of Food Science*, 39: 636–638.
- Rein, M. 2005.** Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. Helsinki: University of Helsinki. pp. 10–14.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20:933–956.
- Robards, K., Antolovich, M. 1997.** Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a Review. *Analyst*, 122:11R–34R.
- Rommel, A., Wrolstad, R.E. 1993.** Ellagic acid content of red raspberry juice as influenced by cultivar, processing and environmental factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1951-1960.
- Ruiz-Rodríguez, B.M., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Tardío, J. 2013.** Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits*, 69: 61-73.
- Saldamlı, İ. 2007.** Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Sarıburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., Uylaşer, V. 2010.** Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of Food Science*, 75: 328-335.
- Seo, A., Morr, C.V. 1984.** Improved high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean protein products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32:530–533.
- Sertsever, A., Gök, V. 2003.** Doğal antioksidanların biyoyararlılığı, 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, 2-4 Ekim 2003, Ankara.

- Shahidi, F., Naczki, M. 1995.** Food Phenolics. Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA, 199-225.
- Shahidi, F., Naczki, M. 2004.** Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Pres, Boca Raton, FL.
- Sharma, A., Gupta, M.N. 2004.** Oil extraction from almond, apricot and rice bran by three-phase partitioning after ultrasonication. *European Journal Lipid Science and Technology*, 106: 183–186.
- Sharma, O.P., Bhat, T.K. 2009.** DPPH antioxidant revisited. *Food Chemistry*, 1202-1205.
- Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M., Saito, K. 2003.** Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Products Reports*, 20: 288-303.
- Sroka, Z., Ciszowski, W. 2003.** Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 753-758.
- Strzelecka, H., Kowalski, J. 2000.** Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa, PWN, Warszawa, p. 202 (in Polish).
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H. 2011.** Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1): 98-106.
- Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S., Akkaya, Z. 2009.** Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu, *Gıda*, 34 (3): 175-182.
- Termentzi, A., Kefalas, P., Kokkalou, E. 2006.** Antioxidant activities of various extracts and fractions of Sorbus domestica fruits at different maturity stages. *Food Chemistry*, 98: 599-608.
- Termentzi, A., Kefalas, P., Kokkalou, E. 2008.** LC-DAD-MS (ESI+) analysis of the phenolic content of Sorbus domestica fruits in relation to their maturity stage. *Food Chemistry*, 106: 1234–1245.
- Thoma, V., Tampouris, K., L. Petrou A.L. 2008.** Kinetics and mechanism of the reaction between chromium(III) and 3,4-dihydroxy-phenyl-propenoic acid (caffeic acid) in weak acidic aqueous solutions. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, doi:10.1155/2008/624583.
- Tomer, D., McLeman, L., Ohmine, S., Scherer, PM., Murray, BK., O'Neill, KL. 2007.** Comparison of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays. *Journal of Medicinal Food*, 10(2): 337-344.
- Tunali, Z., Öztürk, N., Koşar, M., Başer, K.H., Duman, H., Kırimer, N. 2002.** bazı Sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir.
- Usenika, V., Štampar, F., Veberič, R. 2009.** Anthocyanins and fruit colour in plums (*Prunus domestica* L.) during ripening. *Food Chemistry*, 114, 529–534.
- Veličković, J.M., Kostić, D. A., Stojanović, G.S., Mitić, S.S., Mitić, M.N., Randelović, S.S., Đorđević, A.S. 2014.** Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijaska Industrija* 68 (3) 297–303.

- Versari, A., Biesenbruch, S., Barbanti, D., Farnell, P.J., Galassi, S. 1997.** Effect of pectolytic enzymes on selected phenolics compounds in strawberry and raspberry juices. *Food Research International*, 30: 811-817.
- Vinatoru, M., Toma, M., Mason, T.J. 1999.** Ultrasound-assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. In *Advances in Sonochemistry*, Mason TJ (ed), Volume 5, JAI Press, UK, pp. 209–248.
- Vinatoru, M. 2001.** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303–313.
- Yıldız, L., Başkan, K.S., Tütem, E., Apak, R. 2008.** Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle, *Talanta* 77: 304–313.
- Wang, L., Weller, C.L. 2006.** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 300-312.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. 2008.** Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106:804-810.
- Waterman, P.G., Mole, S. 1994.** In: Lawton Jh, Likens Ge, eds. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. The Methods in Ecology Series. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Williams, C. A., Grayer, R. J. 2004.** Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports*. 21: 539-573.
- Wolfenden, B.S., Willson, R.L. 1982.** Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one electron transfer reactions:Pulse radiolysis studies of 2,29-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of Chemical Society. Perkin Transactions*, 2:805–812.
- Wojdylo, A.; Oszmiski, J.; Czemerys, R. 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940-949.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., Lee, J. 2005.** Tracking Color and Pigment Changes in Anthocyanin Products. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9): 423-428.
- Zadernowski, R. 1987.** Studies on phenolic compounds of rapeseed flour. *Acta Acad. Agric. Technol. Olst. Technol. Aliment., Suppl. F*. 21: 3-55.
- Zhang, Q., Zhou, M-M., Chen, P-L., Cao, Y-Y., Tan, X-L. 2011.** Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis for the extraction of luteolin and apigenin from Celery, *Journal of Food Science* , 76, 5.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999.** Determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64:555-559.

EKLER

- EK 1** *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., türü yabani meyvelerin antioksidan kapasite değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi
- EK 2** Değişen pH değerleri için Cr(VI)'nın indirgenme potansiyelinin Nernst Eşitliği dikkate alınarak hesaplanması
- EK 3** Tez çalışması süresince yapılan bilimsel faaliyetler
- EK 4** Farklı hidroliz teknikleri uygulanarak yabani meyve türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/kg örnek)
- EK 5** Toplam fenol, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite miktarları tayininde kullanılan kalibrasyon grafikleri
- EK 6** Patent bilgileri

EK 1 *Sorbus torminalis* L., *Sorbus domestica* L., *Prunus spinosa* L., *Prunus divaricata* Ledeb.subsp. *divaricata*., *Diospyros lotus* L., türü yabani meyvelerin antioksidan kapasite değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

***Prunus spinosa* L. türü için korelasyon ve t testi değerleri**

<i>Prunus spinosa</i> L.	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Ultrasonik ABTS	1					
Ultrasonik CUPRAC	0,99	1,00				
Ultrasonik CHROMAC	1,00	0,99	1,00			
Çözücü ABTS	0,97	0,98	0,96	1,00		
Çözücü CUPRAC	0,98	0,97	0,97	0,99	1,00	
Çözücü CHROMAC	0,96	0,98	0,95	0,99	0,98	1

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Ultrasonik	
	Ultrasonik ABTS	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	13,00871932	12,833
Varyans	24,27070636	23,53509
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,997810484	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,672992579	
P(T<=t) tek-uçlu	0,064328717	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,128657434	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Ultrasonik	
	Ultrasonik ABTS	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	13,19082851	12,833
Varyans	25,7593933	23,53509
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,986573491	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,341596091	
P(T<=t) tek-uçlu	0,106296916	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,212593833	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü ABTS	Çözücü CHROMAC
Ortalama	10,63461353	10,28376909
Varyans	37,16582283	35,59516656
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,994870965	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,776430525	
P(T<=t) tek-uçlu	0,054695467	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,109390933	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü CUPRAC	Çözücü CHROMAC
Ortalama	10,81696304	10,28376909
Varyans	29,12887872	35,59516656
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,982731132	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,407075433	
P(T<=t) tek-uçlu	0,096493785	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,19298757	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

***Prunus divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata* türü için korelasyon ve t testi değerleri**

<i>Prunus divaricata</i> Ledeb. sups. <i>divaricata</i>						
	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Ultrasonik ABTS	1					
Ultrasonik CUPRAC	0,98	1,00				
Ultrasonik CHROMAC	0,98	0,94	1,00			
Çözücü ABTS	0,77	0,74	0,80	1,00		
Çözücü CUPRAC	0,63	0,66	0,63	0,90	1,00	
Çözücü CHROMAC	0,76	0,78	0,76	0,95	0,97	1

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Ultrasonik	
	Ultrasonik ABTS	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	6,012041738	5,824668868
Varyans	14,86378851	10,21665372
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,980079747	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	0,615995115	
P(T<=t) tek-uçlu	0,276577888	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,553155776	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Ultrasonik	
	Ultrasonik CUPRAC	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	5,764424189	5,824668868
Varyans	7,68109808	10,21665372
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,965101482	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-0,213154314	
P(T<=t) tek-uçlu	0,417978334	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,835956669	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü ABTS	Çözücü CHROMAC
Ortalama	5,249187057	4,827729249
Varyans	13,23776935	6,402450608
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,965880086	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	0,978272612	
P(T<=t) tek-uçlu	0,176750769	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,353501537	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü CUPRAC	Çözücü CHROMAC
Ortalama	4,743130597	4,827729249
Varyans	5,347291891	6,402450608
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,969420055	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-0,420203601	
P(T<=t) tek-uçlu	0,342095612	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,684191225	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

***Sorbus domestica* L. türü için korelasyon ve t testi değerleri**

<i>Sorbus domestica</i> L.	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Ultrasonik ABTS	1					
Ultrasonik CUPRAC	0,98	1,00				
Ultrasonik CHROMAC	0,96	0,98	1,00			
Çözücü ABTS	0,98	0,99	0,98	1,00		
Çözücü CUPRAC	0,98	0,99	0,98	1,00	1,00	
Çözücü CHROMAC	0,92	0,95	0,97	0,97	0,98	1,00

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Ultrasonik	
	Ultrasonik ABTS	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	3,361160385	3,564212672
Varyans	2,543660519	2,466960672
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,959152077	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-1,417361127	
P(T<=t) tek-uçlu	0,095026653	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,190053306	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Ultrasonik	
	Ultrasonik CUPRAC	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	3,465153617	3,564212672
Varyans	2,973241857	2,466960672
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,975482794	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-0,792069623	
P(T<=t) tek-uçlu	0,224346366	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,448692733	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü ABTS	Çözücü CHROMAC
Ortalama	2,816280026	3,05583357
Varyans	2,70305755	3,377380398
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,971951456	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-1,665002476	
P(T<=t) tek-uçlu	0,065133888	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,130267775	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü CUPRAC	Çözücü CHROMAC
Ortalama	2,931962714	3,05583357
Varyans	2,579198782	3,377380398
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,976470904	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-0,892545703	
P(T<=t) tek-uçlu	0,197669031	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,395338062	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

***Sorbus torminalis* L. türü için korelasyon ve t testi değerleri**

<i>Sorbus torminalis</i> L.						
	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Ultrasonik ABTS	1					
Ultrasonik CUPRAC	0,94	1,00				
Ultrasonik CHROMAC	0,96	0,97	1,00			
Çözücü ABTS	0,89	0,93	0,91	1,00		
Çözücü CUPRAC	0,83	0,89	0,89	0,91	1,00	
Çözücü CHROMAC	0,89	0,90	0,93	0,89	0,95	1

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek		ABTS-CHROMAC Ultrasonik	
		Ultrasonik ABTS	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama		4,19698544	4,384866276
Varyans		3,452975257	2,819778896
Gözlem		10	10
Pearson Korelasyonu		0,960147283	
Öngörülen Ortalama Farkı		0	
df		9	
t Stat		-1,12130224	
P(T<=t) tek-uçlu		0,14559246	
t Kritik tek-uçlu		1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu		0,291184921	
t Kritik iki-uçlu		2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek		CUPRAC-CHROMAC Ultrasonik	
		Ultrasonik CUPRAC	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama		4,453262393	4,384866276
Varyans		3,84610991	2,819778896
Gözlem		10	10
Pearson Korelasyonu		0,970800798	
Öngörülen Ortalama Farkı		0	
df		9	
t Stat		0,414863015	
P(T<=t) tek-uçlu		0,34397839	
t Kritik tek-uçlu		1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu		0,68795678	
t Kritik iki-uçlu		2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü ABTS	Çözücü CHROMAC
Ortalama	3,410660136	3,483
Varyans	2,021577242	1,76329
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,890873778	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-0,352609527	
P(T<=t) tek-uçlu	0,366248974	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,732497948	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü CUPRAC	Çözücü CHROMAC
Ortalama	3,639067045	3,483
Varyans	1,984335382	1,76329
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,950788217	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,130354348	
P(T<=t) tek-uçlu	0,143774801	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,287549602	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

***Diospyros lotus* L. türü için korelasyon ve t testi değerleri**

<i>Diospyros lotus</i> L.						
	Ultrasonik ekstraksiyon			Çözücü ekstraksiyonu		
	ABTS	CUPRAC	CHROMAC	ABTS	CUPRAC	CHROMAC
Ultrasonik ABTS	1					
Ultrasonik CUPRAC	0,94	1,00				
Ultrasonik CHROMAC	0,96	0,97	1,00			
Çözücü ABTS	0,89	0,93	0,91	1,00		
Çözücü CUPRAC	0,83	0,89	0,89	0,91	1,00	
Çözücü CHROMAC	0,89	0,90	0,93	0,89	0,95	1

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Ultrasonik	
	Ultrasonik ABTS	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	3,965291525	4,474262912
Varyans	0,77655671	1,080852124
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,883591257	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	-3,296451932	
P(T<=t) tek-uçlu	0,004641147	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,009282294	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Ultrasonik	
	Ultrasonik CUPRAC	Ultrasonik CHROMAC
Ortalama	4,498437458	4,474262912
Varyans	1,353032574	1,080852124
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,935004929	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	0,184080503	
P(T<=t) tek-uçlu	0,42901555	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,858031099	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	ABTS-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü ABTS	Çözücü CHROMAC
Ortalama	3,802904912	3,658101283
Varyans	0,411806524	0,49677659
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,821465724	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,12564424	
P(T<=t) tek-uçlu	0,144718337	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,289436674	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek	CUPRAC-CHROMAC Çözücü	
	Çözücü CUPRAC	Çözücü CHROMAC
Ortalama	4,141	3,658101283
Varyans	1,748298889	0,49677659
Gözlem	10	10
Pearson Korelasyonu	0,544175975	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	9	
t Stat	1,376458318	
P(T<=t) tek-uçlu	0,100976808	
t Kritik tek-uçlu	1,833112923	
P(T<=t) iki-uçlu	0,201953617	
t Kritik iki-uçlu	2,262157158	

EK 2 Değişen pH değerleri için Cr(VI)'nın indirgenme potansiyelinin Nernst Eşitliği dikkate alınarak hesaplanması

$$E_{H_{\text{ücre}}=E^0} - \frac{0,05916}{6} \log \frac{[Cr^{+3}]^2}{[(Cr_2O_7)^{-2}][H^+]^{14}}$$

pH=2,5

$$E^0=1,33 \text{ V}$$

$$[H^+] = 3,16 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[Cr^{+3}] = 1 \text{ M}$$

$$[(Cr_2O_7)^{-2}] = 1 \text{ M}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}} = 1,33 - \frac{0,05916}{6} \log \frac{[1]^2}{1 \times [3,16 \times 10^{-3}]^{14}}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}}=0,98 \text{ V}$$

pH=2,6

$$E^0=1,33 \text{ V}$$

$$[H^+] = 2,51 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[Cr^{+3}] = 1 \text{ M}$$

$$[(Cr_2O_7)^{-2}] = 1 \text{ M}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}} = 1,33 - \frac{0,05916}{6} \log \frac{[1]^2}{1 \times [2,51 \times 10^{-3}]^{14}}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}}=0,97 \text{ V}$$

pH=2,7

$$E^0=1,33 \text{ V}$$

$$[H^+] = 1,99 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[Cr^{+3}] = 1 \text{ M}$$

$$[(Cr_2O_7)^{-2}] = 1 \text{ M}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}} = 1,33 - \frac{0,05916}{6} \log \frac{[1]^2}{1 \times [1,99 \times 10^{-3}]^{14}}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}}=0,96 \text{ V}$$

pH=2,8

$$E^0=1,33 \text{ V}$$

$$[H^+] = 1,58 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[Cr^{+3}] = 1 \text{ M}$$

$$[(Cr_2O_7)^{-2}] = 1 \text{ M}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}} = 1,33 - \frac{0,05916}{6} \log \frac{[1]^2}{1 \times [1,58 \times 10^{-3}]^{14}}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}}=0,95 \text{ V}$$

pH=2,9

$$E^0=1,33 \text{ V}$$

$$[H^+] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[Cr^{+3}] = 1 \text{ M}$$

$$[(Cr_2O_7)^{-2}] = 1 \text{ M}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}} = 1,33 - \frac{0,05916}{6} \log \frac{[1]^2}{1 \times [1,25 \times 10^{-3}]^{14}}$$

$$E_{H_{\text{ücre}}}=0,93 \text{ V}$$

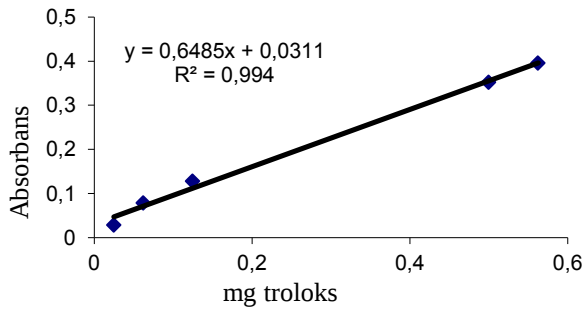
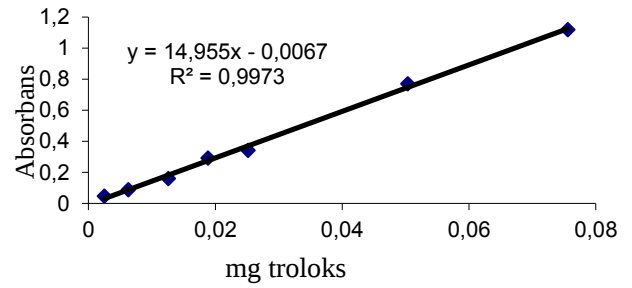
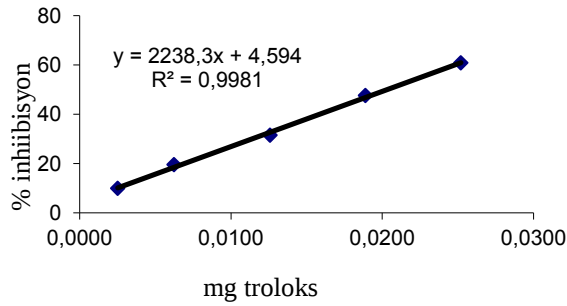
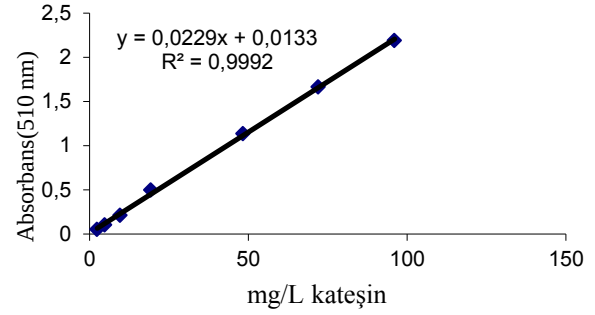
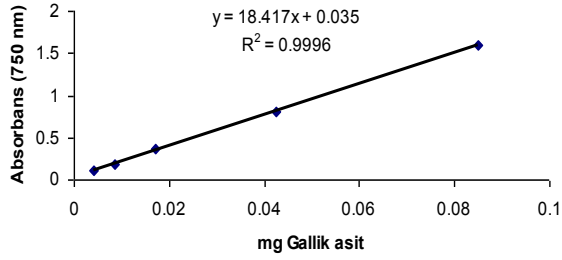
EK 3 Tez çalışması süresince yapılan bilimsel faaliyetler

1. Cansev, M., Orhan, F., Yaylagül, E.O., Işık, E., Türkyılmaz, M., Aydın, S., Gümüş, A., Sevinç, C., Coşkun, N., Ulus, İ.H., Wurtman, R.J. 2015. Evidence for the existence of pyrimidinergic transmission in rat brain. *Neuropharmacology*, 91:77-86.
2. Işık, E., Şahin, S., Demir, C. 2013. Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111: 119-124. (Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi başlıklı 2013/06324 numaralı patent başvurusu, bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar doğrultusunda yapılmıştır. Patent Başvuru tarihi: 28 Mayıs 2013. Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi Türkiye TR 2013 06324 B).
3. Aybastier, Ö., Işık, E., Şahin, S., Demir, C. 2013. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Blackberry Leaves Using Response Surface Methodology. *Industrial Crops and Products*, 44, 558– 565.
4. Şahin, S., Aybastier, Ö., Işık, E. 2013. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. *Food Chemistry*, 141:1361-1368.
5. Doğal ürünler diyabet hastalığına çare midir? E. Işık, C. Demir, H. Malyer, Uludağ Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Haftası, 11-13 Mart 2013, Bursa.
6. Determination of antioxidant capacities of individual and combined phenolics by CHROMAC method, Demir C., Işık E., Şahin S., 6th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 10-14 September 2013, Trabzon, Turkey.
7. Kara Hurma (*Diospyros lotus* L.) Yabani Meyvesinin Fenolik Bileşiklerinin Farklı Ekstraksiyon Metotlarında HPLC-DAD İle Belirlenmesi, Işık E., Demir C., Malyer H., Kromatografi Kongresi, 19-22 Haziran 2013, Bursa.
8. Aybastier Ö., Işık E., Şahin S., Demir C., Böğürtlen Yaprığından Antioksidan Maddelerin Ultrasonik Ekstraksiyon Parametrelerinin Kemometrik Optimizasyonu, VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 3–7 Eylül 2012, Hatay.
9. Işık E., Aybastier Ö., Demir C., Antioksidan Özelliğe Sahip Rutin'in Ultrasonik Enzimatik Hidroliz Koşullarının Optimizasyonu, VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 3-7 Eylül 2012, Hatay.
10. Işık E., Şahin S., Demir C., Determination of Phenolic Compounds in *Laurus Nobilis* L. with Different Extraction and Hydrolysis Methods, 3rd PAK-TURK Conference on Chemical Sciences 13-15 September 2012, Bursa.
11. E. Işık, S. Şahin, C. Demir, The Acidic Hydrolysis of Some Hydroxycinnamic Acid Derivatives, 8th Aegean Analytical Chemistry Days İzmir, TURKIYE 16-20 September 2012.
12. The Acidic Hydrolysis Mechanism of Phenolic Compounds, Demir C., Şahin S., Işık E., 8th Aegean Analytical Chemistry Days İzmir, TURKIYE 16-20 September 2012.
13. CHROMAC Yöntemiyle Doğal Ürünlerde Antioksidan Kapasite Tayini, C.Demir, E. Işık, S. Şahin, VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 3-7 Eylül 2012, Hatay.
14. The Effect of Extraction Methods on the Phenolic Content and Antioxidant Capacity of *Prunus* L, Grown in Bursa (Turkey), E. Işık, S. Şahin, C. Demir, 8th Aegean Analytical Chemistry Days İzmir, TURKIYE 16-20 September 2012.
15. Yabani Eriğin Antioksidan Özelliğinin Araştırılması, E. Işık, S. Şahin, C. Demir, H. Malyer, Uludağ Üniversitesi 2. Bilgilendirme & Ar-ge Günleri, 13-15 Kasım 2012, Bursa.

EK 4 Farklı hidroliz teknikleri uygulanarak yabancı meyve türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/kg örnek)

Ultrasonik ekstraksiyon	Hidroliz tekniği	KLA	RA	EA	KA	FA	PKA	RUTİN	KUER	2-HDSA		
<i>Sorbus domestica</i> L.	Su ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
	pH=5 tampon ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
<i>Sorbus torminalis</i> L.	Su ve enzim	KLA	KA	RA	EA	RUTİN	KAMGLK	2-HDSA	KUER	KAM		
	pH=5 tampon ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
<i>Prunus spinosa</i> L.	Su ve enzim	KLA	KA	FA	PKA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR	
	pH=5 tampon ve enzim					1,82±0,06	1,21±0,08	x	2,6±0,14	0,09±0,04		
	Bazik hidroliz	x	x	x	x	1,65±0,06	1,10±0,07	x	x	x		x
	Asidik-bazik hidroliz	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
<i>Prunus divaricata</i> Ledep. <i>sups. divaricata</i> L.	Su ve enzim	KLA	KA	FA	PKA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR	
	pH=5 tampon ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
<i>Diospyros lotus</i> L.	Su ve enzim	GA	KA	RA	EA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR	KLA
	pH=5 tampon ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Çözücü ekstraksiyonu <i>Sorbus domestica</i> L.	Su ve enzim	KLA	RA	EA	KA	FA	PKA	RUTİN	KUER	2-HDSA		
	pH=5 tampon ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Sorbus torminalis</i> L.	Su ve enzim	KLA	KA	RA	EA	RUTİN	KAMGLK	2-HDSA	KUER	KAM		
	pH=5 tampon ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
<i>Prunus spinosa</i> L.	Su ve enzim	KLA	KA	FA	PKA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR	
	pH=5 tampon ve enzim	x	6,34±0,32	x	x	0,23±0,02	x	x	0,80±0,03	x	x	
	Bazik hidroliz	x	4,21±0,28	x	x	0,38±0,02	x	x	x	x	x	
	Asidik-bazik hidroliz	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Prunus divaricata</i> Ledep. <i>sups. divaricata</i> L.	Su ve enzim	KLA	KA	FA	PKA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR	
	pH=5 tampon ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Diospyros lotus</i> L.	Su ve enzim	GA	KA	RA	EA	RUTİN	KAMGLK	ISOKUER	KUER	KAM	MR	KLA
	pH=5 tampon ve enzim	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

EK 5 Toplam fenol, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite miktarları tayininde kullanılan kalibrasyon grafikleri



EK 6 Patent bilgileri



patent dosya takibi



Patent Başvurusu Bilgileri

Başvuru No	2013/06324	Başvuru Tarihi	28.05.2013
Evrak No	2013-G-181246	Tescil Numarası	2013 06324

Patent Başvurusuna İlişkin İşlemler

Tarih	Tebliğ Tarihi	İşlem
16.11.2016	18.11.2016	Devir İşlemi Yapıldı.
17.03.2016		Devir Talebi
16.08.2016		Başvuru/Patent Sahipliğinde Değişiklik Talebi
21.06.2016	30.06.2016	Belge Gönderildi
		Belge Düzenleme Ücreti Onaylandı.
13.05.2016		Belge Düzenleme Ücreti Geldi
18.01.2016		1.İnceleme Raporu Geldi.
29.01.2016	18.02.2016	1. İnceleme Raporu Olumlu - Belge Kararı
		1. İnceleme Ücreti Ödeme Talebi Onaylandı
19.10.2015		İnceleme Ücreti Ödeme Talebi
19.10.2015		1. İnceleme Talebi
28.04.2015		Yıllık Ücret Ödeme Talebi
		İncelemeli Sistem Tercihi Onaylandı.
25.02.2015		İncelemeli Sistem Tercihi
13.03.2015	25.03.2015	Araştırma Raporu Onaylandı.Sistem Tercihi İstendi.
11.03.2015		Araştırma Raporu Geldi.
14.01.2015		Araştırma Raporu Geldi.
27.08.2014		Eksik Ücret - Evrak Tamamlama Talebi
		Araştırma Ücreti Ödeme Talebi Onaylandı
12.08.2014	12.11.2014	Araştırmaya Gönderildi
		Eksik Ücret / Evrak İstendi
02.05.2014		Yıllık Ücret Ödeme Talebi
25.02.2014		Araştırma Ücreti Ödeme Talebi
25.02.2014		Araştırma Talebi
10.12.2013	27.12.2013	Bilgi Yazısı Gönderildi
29.07.2013	14.08.2013	Şekli Kontrol Yapıldı. Başvuru / İstem / Fasikül Onaylandı.
28.05.2013		Veri Girişi Hatalı
28.05.2013		Online Başvuru Kontrolü Yapıldı.

Yayınlar

Yayın Tarihi	Açıklama
21.06.2016	Verilen Patent / Faydalı Model İlanı
21.04.2015	Araştırma Raporunun İlanı
21.04.2015	İncelemeli Sistem Tercihinin İlanı
22.12.2014	Başvuru Yayınının İlanı

Ödenen Yıllık Ücretler

Sıra	Yıl	Ödeme Tarihi	Dekont Numarası	Ödenen Miktar
2	2014	02.05.2014	17035145	170
3	2015	21.04.2015	2015-04-21- 16.31.52.257093	200
4	2016	18.04.2016	2016-04-18- 15.49.26.481551	255

Başvuru Bilgileri		
Başvuru Numarası : 2013/06324	Evrak Numarası : 2013-G-181246	Tescil Numarası : 2013 06324
Başvuru Tarihi : 2013/05/28	Evrak Tarihi : 2013/05/28	Tescil Tarihi : 2016/06/21
Başvuru Şekli : Ulusal Başvuru	Koruma Tipi : Patent	Yayın Tarihi : 2014/12/22
Başvuru Sahipleri		Buluşun Tasnif Sınıfları
SALİHA ŞAHİN Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Nilüfer Bursa CEVDET DEMİR Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Görükle Nilüfer Bursa		C09K 15/00 G01N 33/52 A61P 39/06
Buluş Sahipleri		
SALİHA ŞAHİN Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Nilüfer Bursa ESRA IŞIK Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Nilüfer Bursa CEVDET DEMİR Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Görükle Nilüfer Bursa		
Vekil Bilgileri		
HAKAN ÖZCAN (DESTEK PATENT A.Ş.) ECLIPSE BUSINESS, AKASYA SOK. D BLOK NO:5 MASLAK/İSTANBUL		
Buluş Başlığı		
Antioksidan kapasite tayini yöntemi.		
Buluş Özeti		
Gıda, sağlık ve çevre alanlarında kullanılan ürünlerin, toplam antioksidan düzeylerini belirlemeyi sağlamak üzere; antioksidan maddeleri içeren, örnek çözeltinin hazırlanması; tampon çözeltisi hazırlanması ve örnek çözeltiye eklenmesi; antioksidan maddeyi yükseltgemek üzere, dikromat (Cr2072-) çözeltisinin hazırlanması ve elde edilen çözeltiye eklenmesi ile; redoks reaksiyonunun gerçekleşmesi; 1,5-difenilkarbazit çözeltisinin hazırlanması; bahsedilen redoks reaksiyonuna girmeyip, geriye kalan Cr (VI) çözeltisine, hazırlanan 1,5-difenilkarbazit çözeltisinin eklenerek, kompleksleşme reaksiyonu oluşturmaları; absorban ölçümünün yapılması, işlem adımlarını içeren yöntem ile ilgilidir.		

Kaynak:

<http://online.turkpatent.gov.tr/web/index.html>

<http://online.turkpatent.gov.tr/EPATENT/servlet/StatusSearchRequestManager>

<http://online.turkpatent.gov.tr/EPATENT/servlet/PreSearchRequestManager>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra IŞIK
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 08.01.1984
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):
Lise : Bursa Çelebi Mehmet Lisesi, 2002.
Lisans : Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 2006
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:
İletişim (e-posta) : esariburun@uludag.edu.tr
Yayınları:

1. Cansev, M., Orhan, F., Yaylagül, E.O., Işık, E., Türkyılmaz, M., Aydın, S., Gümüş, A., Sevinç, C., Coşkun, N., Ulus, İ.H., Wurtman, R.J. 2015. Evidence for the existence of pyrimidinergetic transmission in rat brain. *Neuropharmacology*, 91:77-86.
2. Aybastier, Ö., Işık, E., Şahin, S., Demir, C. 2013. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Blackberry Leaves Using Response Surface Methodology. *Industrial Crops and Products*, 44, 558– 565.
3. Işık, E., Şahin, S., Demir, C. 2013. Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111: 119-124.
4. Şahin, S., Aybastier, Ö., Işık, E. 2013. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from Artemisia absinthium using response surface methodology. *Food Chemistry*, 141:1361-1368.
5. Şahin, S., Işık, E., Demir, C. 2012. Prediction of total phenolic content in extracts of Prunella species from HPLC profiles by multivariate calibration. *ISRN Chromatography*, doi:10.5402/2012/120780.
6. Şahin, S., Işık, E., Aybastier, Ö., Demir, C. 2012. Orthogonal signal correction-based prediction of total antioxidant activity using partial least squares regression from chromatograms. *Journal of Chemometrics*, 26, 390-399.
7. Işık, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C. 2011. Determination of Total Phenolic Content of Raspberry and Blackberry Cultivars by Immobilized Horseradish Peroxidase Bioreactor. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24, 944-949.
8. Aybastier, Ö., Şahin, S., Işık, E., Demir, C. 2011. Determination of total phenolic content in Prunella L. by horseradish peroxidase immobilized onto chitosan beads. *Analytical Methods*, 3, 2289-2297.
9. Türkben, C., Sarıburun, E., Demir, C., Uylaşer, V. 2010. Effect of freezing and frozen storage on phenolic compounds of raspberry and blackberry cultivars. *Food Analytical Methods*, 3:144-153.
10. Sarıburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., Uylaşer, V. 2010. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. *Journal of Food Science*, 75: 328-335.
11. Şahin, S. Sarıburun, E., Demir, C. 2009. Net analyte signal-based simultaneous determination of dyes in environmental samples using moving window partial least squares regression with UV-vis spectroscopy. *Analytical Methods*, 1: 208-214.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Esra IŞIK
Tez Adı	YABANİ <i>PRUNUS</i> , <i>SORBUS</i> VE <i>DIOSPYROS</i> TÜRRLERİNDE BAZI FENOLİK MADDELERİN TAYİNİ VE YENİ BİR ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN METODUNUN (CHROMAC) GELİŞTİRİLMESİ
Enstitü	FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anabilim Dalı	KİMYA
Tez Türü	DOKTORA
Tez Danışman(lar)ı	PROF. DR. BELGİN İZGİ
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	☐ Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum ☐ Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum ☒ Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	☐ Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin Veriyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih :27.04.2017

İmza :