

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

***Arbutus unedo* L. MEYVE VE YAPRAKLARININ**
BİOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Bilgen YÖRÜYÜŞ

Referans no: 10257508

EDİRNE-2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

***Arbutus unedo* L. MEYVE VE YAPRAKLARININ**
BİOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Bilgen YÖRÜYÜŞ

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2019/162

Tez No: 10257508

EDİRNE-2022



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden, yardımını ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU'na, katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Gülay ŞEREN'e, Prof. Dr. Özlem DEMİRKİRAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Hakan KOLANCILAR'a, Dr. Öğr. Üyesi Hatice PALÜZAR'a, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa SUNDU'ya, Öğr. Üyesi Derya ALTINTAŞ'a Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki ve Arda Meslek Yüksek Okulu'ndaki değerli hocalarıma ve değerli çalışanlarına, her zaman yanımda olan sevgili aileme, desteklerinden dolayı TUTAGEM ve TÜBAP (2019-162) birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLERİ	2
SERBEST RADİKALLER	2
GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
BULGULAR	33
TARTIŞMA	59
SONUÇLAR	70
ÖZET	73
SUMMARY	75
KAYNAKLAR.....	77
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	80

SİMGİ VE KISALTMALAR

ABTS:	2,2'-Azinobis (3-etilbenzentiazolin-6-sülfonat)
BHA:	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT:	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
DPPH:	1,1'-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
FCR:	Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP:	Demir (II) iyonu indirgeme gücü
FTC:	Ferrik tiyosiyanat
GAE:	Gallik asit eşdeğeri
MA:	Kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktı
MS:	Kocayemiş meyve-su ekstraktı
YA:	Kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktı
NADPH:	Nikotinamidadenindinükleotid fosfat
NAS:	N-asetil sistein
NBT:	Nitrotetrazolyum blue klorür

ORAC:	Oksijen radikalini absorplama kapasitesi
PKE:	Pirokateşol eşdeğeri
PMS:	Fenazin metasülfat
RNS:	Reaktif azot türleri
ROT:	Reaktif oksijen türleri
RSS:	Reaktif sülfür türleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
SR:	Serbest radikal
TPC:	Toplam fenolik madde
TRAP:	Toplam radikal tutma parametresi

GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm canlıların büyümesi ve gelişmesini sağlayan besin kaynakları; karbonhidrat, protein ve yağlardır. Karbonhidrat, protein ve yağlar dışında, canlının zorlu yaşam şartlarına dayanma gücünü sağlayan, sağlık üzerinde olumlu etkileri olan metabolitlere de bioaktif bileşenler denir. Bitkisel kaynaklarda çok çeşitli bioaktif bileşenler olmakla beraber, gıdalarda genellikle az miktarda bulunurlar. Bioaktif bileşenlerin insan sağlığı açısından; obezite, iltihaplanmalar, nörolojik bozukluklar, kalp-damar hastalıkları, kanser, diyabet, kemik erimesi ve bağışıklık sistemi gibi hastalıklarda pozitif etkileri vardır (1).

Sebze ve meyvelerde bulunan bioaktif bileşenlerin, serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif strese karşı koruyucu özelliği olduğu, aynı zamanda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda antioksidan aktivite gösterdikleri belirtilmektedir (2).

Çalışmada, *Arbutus unedo* L. meyve ve yaprağının, su ve etil alkol ekstraktlarının, toplam antioksidan aktiviteleri farklı metodlar kullanılarak incelenmiştir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için ekstraktların; toplam flavonoid ve fenolik içeriği, Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi, DPPH• radikali giderme aktivitesi, H_2O_2 giderme aktivitesi, Fe^{+3} iyonlarını indirgeme kapasitesi, ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi, karotenoid içeriği, Linoleik asit sisteminde FTC metodu ile toplam antioksidan aktivitesi ve LC-MS/MS ile fenolik madde içeriği tayin edilmiştir. Sonuçlar, standart olarak kullanılan α -tokoferol, gallik asit, kuersetin, gallik asit, BHA, BHT ve kateşin gibi antioksidan maddelerle ve literatürdeki veriler ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

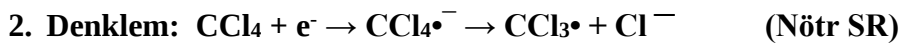
SERBEST RADİKALLER (SR)

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşlenmemiş tek elektron içeren ve bu elektrondan dolayı kararsız, diğer maddelerle reaksiyona girme ve kararlı olma isteği oldukça fazla olan, atom veya moleküllerdir (3).

Serbest Radikallerin Özellikleri

Bir bileşik, bir elektron kaybederek ya da bir elektron alarak serbest radikal oluşturabilir. Bir atom veya molekülün tek elektronunu göstermek için sembol ya da formülün yanına bir nokta konur (X•).

Serbest radikaller pozitif yüklü, nötral veya negatif yüklü olabilirler (4). Denklem 1’de, fenotiyazin ilaçlarındaki prometazin (Pr), hidroksil radikalleri yardımı ile prometazin radikal katyonuna yükseltgenir. Denklem 2’de ise, nötr triklor karbon radikali oluşmaktadır. Denklem 3’te, oksijen, süperoksit radikal anyonuna indirgenir.



Serbest radikaller genellikle kararsızdırlar.

Hem organik hem de anorganik molekül yapıda olabilirler.

Serbest radikaller oksijen (reaktif oksijen türleri: ROT), azot (reaktif azot türleri: RNT) ve sülfür (reaktif sülfür türleri: RST) kaynaklı olabilirler (Tablo1) (5).

Tablo 1. Bazı serbest reaktif türleri (5)

Adı	Formülü	Tanımı
Hidrojen atomu	H•	En basit serbest radikal
Süperoksit	O₂•⁻	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil	•OH	En reaktif oksijen radikali olup, insan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Triklorometil	CCl₃•	CCl ₄ metabolizması sonucu üretilen C merkezli radikaldır. O ₂ ile genellikle hızlı reaksiyon verir.
Tiyil	RS•	Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adıdır.
Peroksil, Alkoksil	RO₂•, RO•	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikallerdir.
Nitrik oksit	NO•	L-arginin amino asidinden in vivo koşullarda üretilir.
Azotdioksit	NO₂•	NO•'nun O ₂ ile reaksiyonundan oluşur. Kirli hava sigara dumanı gibi ortamlarda bulunur.
Hidrojen peroksit	H₂O₂	Reaktivitesi düşüktür
Singlet oksijen	¹O₂	Oksijenin güçlü oksidatif formudur.

Serbest radikaller, hücrede dış etkenlerle ya da metabolizmanın normal ürünleri olarak oluşabilirler.

Oksijen radikalleri, enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyonlar için gerekli olmasına karşın, radikallerin yapıları ve etkili olduğu yere göre de hücresel hedefler risk altında olup, hücresel hasara neden olabilirler.

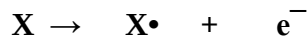
Serbest Radikal Oluşumu

Serbest radikaller hücresel koşullarda 3 temel mekanizma ile oluşmaktadır (6).

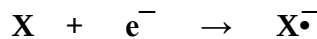
1) Kovalent bağlı bir molekülün bölünmesinde, molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalması (Homolitik Bölünme) ile oluşabilir.



2) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile oluşabilir.



3) Normal bir moleküle elektron transferi ile oluşabilir.



SERBEST RADİKAL ÇEŞİTLERİ

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Organik moleküllerin yapıtaşları karbon, oksijen, hidrojen, nitrojen ve kükürttür. Aerobik solunum yapan organizmalarda, hücrelerde gerçekleşen metabolik reaksiyonlar için gerekli olan oksijenin %90'ı mitokondride, oksidatif fosforilasyon esnasında kullanılır. Kullanılan bu oksijenin de %1-3'ü mitokondrilere ROT'a dönüştürülür (3).

Oksijenden oluşan önemli serbest radikaller arasında süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen yer almaktadır.

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$):

Serbest oksijen radikalleri içinde ilk oluşan oksijen radikali, süperoksit radikalidir. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), oksijen molekülüne bir elektron katılarak oluşur.



Süperoksit radikali, çoğunlukla hücrenin mitokondrisinde oluşur. Memeli hücresinde ATP'nin ana kaynağı olan mitokondriyal elektron transfer sistemi, hayatın devamı için gereklidir. Enerji dönüşümü sırasındaki elektron kaçakları oksijenin, $O_2^{\bullet-}$ serbest radikale dönüşümüne neden olur (3).

Süperoksit radikali hem yükseltgen hem de indirgen özelliği ile dopamin, adrenalin, askorbat veya hidroksil amini oksitler, nitroblue tetrazolyum veya sitokrom C'yi indirger. Süper oksit radikali çok fazla reaktif olmamasına rağmen, hücrede ciddi hasara neden olan hidrojen peroksit ve daha sonra hidroksil radikallerinin öncüsü olduğu için önemlidir (7).

Hidrojen peroksit (H_2O_2):

Hidrojen peroksit; süperoksit asidik ortamda, bir elektron eklenmesi veya moleküler oksijene iki elektron eklenmesiyle oluşmaktadır (8).

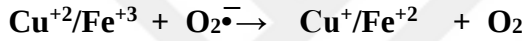


Hidrojen peroksit, nötrofillerin fagozomlarındaki miyeloperoksidaz enzimi tarafından hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülür. Bu sırada geçiş metallerinin oksidasyonu yoluyla da $OH^{\bullet}$ oluşmasına neden olarak ROT moleküllerinin üretilmesinde bir aracı olarak rol oynar. Hidrojen peroksidin bir diğer önemli görevi de hücre içi sinyal molekülü rolünü yerine getirmektir (3).

Hidrojen peroksit, serbest radikal olmamasına rağmen yine de çok önemlidir. Çünkü hidrojen peroksit, düşük konsantrasyonlarında (20-80 µm) bile biyolojik membranlara nüfuz ederek, DNA harabiyeti geliştirmektedir (9).

Hidroksil radikali (•OH):

Hidrojen peroksit, Fe^{+2} ve Cu^{+} veya diğer geçiş elementleri varlığında indirgenerek OH^{-} 'ye dönüştürüldüğü reaksiyona “fenton reaksiyonu” denir. Süperoksit radikali fenton reaksiyonu ile bağlantı kurarak oluşan metal iyonlarının yeniden kullanılmasında önemli bir görev alır. Bu iki reaksiyona “Haber-Weiss reaksiyonu” adı verilir. $OH\bullet$ oluşmasında, geçiş metalleri önemli bir rol oynarlar. Hidroksil radikali, biyomoleküller ile daha güçlü reaksiyona girdiği için, biyolojik sistemlere diğer ROT'lardan daha fazla zarar verebilir (3).



Singlet oksijen (1O_2):

Singlet oksijen, radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Oksijenin eşleşmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu kendi spin yönünü değiştirmesi veya bulunduğu orbitalden başka bir orbitale geçmesi sonucunda oluşur (7).

Reaktif Azot Çeşitleri (RNS)

Nitrik oksit, en önemli reaktif azot çeşitleri arasında yer almaktadır. $NO\bullet$ memeli hücrelerindeki endotel (damar iç yüzü), nöron, makrofaj gibi farklı hücrelerde L-arjininden nitrik oksit sentaz enzimi aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (10).

$NO\bullet$ süperoksit gibi diğer endojen serbest radikallerle tepkimeye girerek peroksinitriti meydana getirir. Oluşan peroksinitrit oksidan özelliği ile DNA ve protein gibi biyolojik moleküllerde hasar oluşturabilir (11).

SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI

Organizmadaki serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından meydana gelir (3).

Endojen Kaynaklar

1. Zihinsel stres veya vücut yorgunluğundan kaynaklanan stres, toksik yan ürün olarak,
2. Aerobik solunum sırasında, mitokondride elektron transport sistemi tarafından, kataliz edilen oksijenlerden dolayı yan ürün olarak,
3. İltihaplanma durumunda, sitokinler serbest bırakılır ve bunun sonucunda nötrofiller ve makrofajlar,
4. Otoksidasyon reaksiyonları sırasında, ksantin oksidaz (XO) ile nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz gibi enzimlerle endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde meydana gelen elektron kaçaklarından,
5. Lipit peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan,
6. Düz kas hücreleri, plateletler ve araşidonik asit metabolizması tarafından,
7. İmmun sistem hücreleri patojenlere yanıt olarak SR üretebilir.

Eksojen Kaynaklar

1. UV ışınlar, mikrodalga ışınları, X-ray, gama ışınları,
2. Volkanik olaylar, orman yangınları,
3. Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması,
4. Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirleticiler,
5. Temizlik ürünleri, tiner, böcek ilaçları, tutkal, boya ve parfümler gibi kimyasallar,
6. Benzen, formaldehit, karbonmonoksit, asbest, toluen gibi hava kirleticiler,
7. Alkol ve sigara kullanımı, sigara dumanı, egzoz dumanı, eksojen olarak serbest radikal üretimine neden olabilir (3).

SERBEST RADİKALLERİN YARARLARI

Düşük yoğunluklarda olduklarında ROT ve RNS'nin yararlı etkilerinden de söz etmek mümkündür. Reaktif oksijen türleri ve RNS'nin bazı yararlı faaliyetleri arasında:

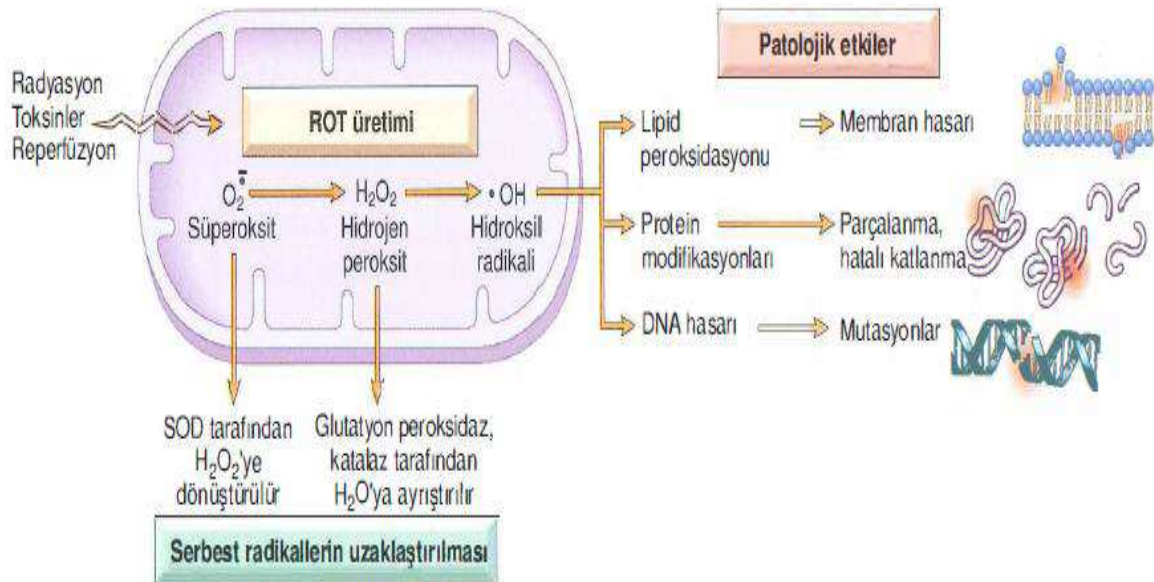
1. Mitokondride ATP üretimi, hücre büyümesi ve düşük konsantrasyonda mitojenik yanıtlara neden olma,

2. Fagositoz aracılığıyla enfeksiyonlara karşı savunma,
3. Sitotoksik lenfositler ve makrofajlar tarafından kanser hücrelerini öldürme,
4. Sitokrom p450 tarafından ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu,
5. Düşük konsantrasyonda olduklarında; non-reseptör tirozin kinaz aktivasyonu, ROT ve RNS'nin nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, tirozin amino asidinin fosfatlanma aktivasyonu, intrasellüler depolardan Ca'un salınımı, bazı sitokinler ve büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonu gibi hücrel sinyaller üzerine önemli rolleri vardır (3).

SERBEST RADİKALLERİN ZARARLARI

Biyolojik serbest radikaller kararsız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres (hasar) meydana getirirler (Şekil 1). Organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması oksidatif stres, olarak tanımlanmaktadır.

Radikaller; protein, lipid ve nükleik asit gibi temel hücrel bileşenlerde hasara yol açabilme yeteneğindedir. Oluşan bu hasarın yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, senil demans, kanser, ateroskleroz, amiloidoz, ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynadığı bilinmektedir (12).



Şekil 1. Serbest radikallerin hücrede meydana getirdiği hasar (13).

BİOAKTİF BİLEŞİKLER

Bioaktif bileşenler, bitkisel kaynaklarda bulunan, bitkinin büyümesi ve gelişmesinde çeşitli görevlere sahip olan metabolitlerdir. Bitkiye has renk, tat ve koku özelliklerini kazandırdıkları gibi ayrıca bakteri, virüs, mantar ve haşerelere karşı da koruyucu özellik gösterirler. Bitkilerde daha çok esterleşmiş olarak veya glikozidlere bağlı olarak bulunurlar. Bioaktif bileşenlerin yapılarında bir aromatik halka ile en az bir hidroksil (-OH) grubu bulunur. Bioaktif bileşiklerin, -OH gruplarının sayısı, çeşitli karbonhidrat ve organik asitlerle yapmış oldukları bağlar, aromatik halkalarının yapısal farklılıklarına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, 30.000'den fazla biyoaktif bileşen olduğu ve bunların yaklaşık 5.000-10.000 kadarının günlük diyetimizde yer aldığı tahmin edilmektedir. Biyoaktif bileşenlerin in vitro ve in vivo koşullarda geniş aralıkta antioksidan aktivite gösterdikleri bilinmektedir (2).

ANTIOKSİDANLAR

Antioksidanlar, hücreyi zararlı maddelere karşı savunarak kalkan görevi gören, serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ve yapısında çoğunlukla fenolik madde bulunduran moleküller olup, ayrıca karbonhidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hedef moleküllerdeki hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini tutarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (14).

Antioksidanlar, dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisiz hale getirir (15).

- Temizleme etkisi: Oksidanları daha zayıf bir moleküle çevirerek gerçekleşir.
- Baskılama etkisi: Oksidan maddelere bir hidrojen katılarak etkisiz hale getirerek gerçekleşmektedir.
- Onarma etkisi: Oksidanların oluşturduğu hasarı ortadan kaldırarak gerçekleşmektedir.
- Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak, fonksiyonlarını engelleyerek gerçekleşir. Hemoglobini ve E vitamini tarafından yapılır.

ANTIOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

Antioksidanların farklı başlıklar altında sınıflandırılmaları yapılabilmektedir. Başlıca sınıflandırma şekli; doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olarak sınıflandırılmasıdır.

Doğal antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılır (16).

DOĞAL ANTİOKSİDANLAR:

1. Enzimatik antioksidanlar:

Enzim yapısındaki antioksidanlardır.

a. Süperoksit dismutaz (SOD):

Organizmada serbest radikallerin karşılaştıkları ilk enzim SOD'tur. SOD enzimi, süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir. Hidrojen peroksit ürettiği için hidrojen peroksiti uzaklaştırmak için katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile birlikte çalışır (16).



b. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px):

Glutatyon peroksidaz hücre içinde hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan asıl sorumlu olan enzim olup, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini engeller. Glutatyon (G-SH), hidrojen peroksit varlığında, glutatyon peroksidaz enzimi ile okside glutatyon (GSSG) yükseltgenir (17).



c. Glutatyon redüktaz (GSH-Red):

Glutatyon redüktaz mitokondri ve sitozolde bulunur, yapısında selenyum bulunur. GSH-Px'in katalizlediği, hidroperoksitlerin indirgenmesi sırasında oluşan okside glutatyonun (GSSG), NADPH yardımıyla indirgeyerek, glutatyon (GSH) dönüşümünü katalizler (16).



ç. Katalaz (CAT):

Katalaz, aerobik hücrelerde antioksidan enzim olup en çok görev yaptığı doku böbrek ve karaciğerdir. Katalaz, hidrojen peroksidin, su ve oksijene yıkımını katalizler (18).

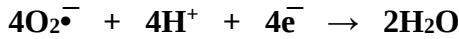


d. Glutasyon S-Transferazlar (GST):

İki protein alt biriminden oluşmakta olup, araşidonik asit ve linoleat hidroksiperoksitleri olmak üzere lipithidroperoksitlere karşı aktivite göstermektedir (19).



e. Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Süperoksitin zararlı etkisini gidermekte görev alır. Solunum zincirinin en son enzimi olup, belirtilen reaksiyon sonunda yakıt maddelerinin oksidasyonu sona ererek bol miktarda ATP sentezlenir.



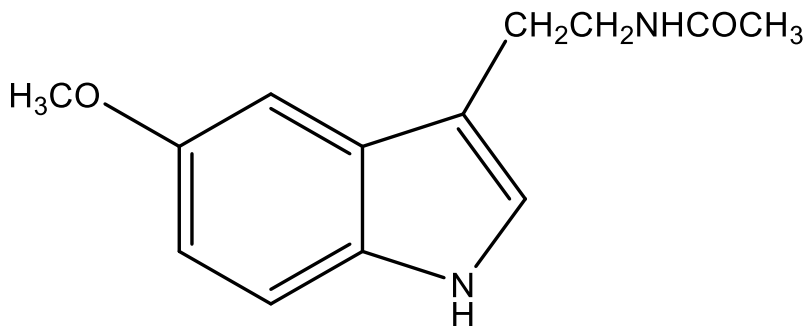
f. Peroksiredoksinler:

H₂O₂ miktarını kontrol etmek ve oksidatif strese karşı görev yapmaktadır.

2. Enzimatik olmayan antioksidanlar:

a. Melatonin:

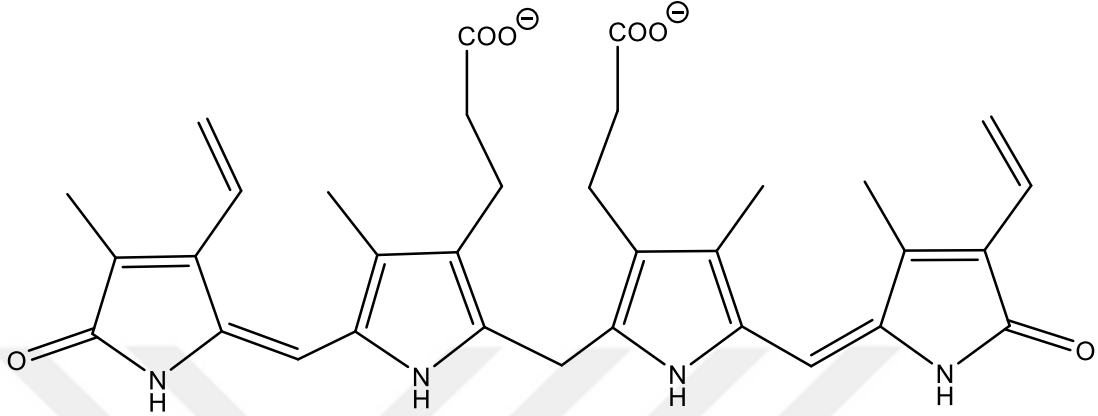
Şekil 2'de yapısı gösterilen melatonin, uyku, üreme gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinden sorumlu olan bir hormondur. Melatonin, oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye etmekte, böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebilmektedir (20). Melatonin ayrıca, vücudun biyolojik saatini korur, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında etkili bir hasar önleyicidir.



Şekil 2. Melatoninin yapısı

b. Biluribin:

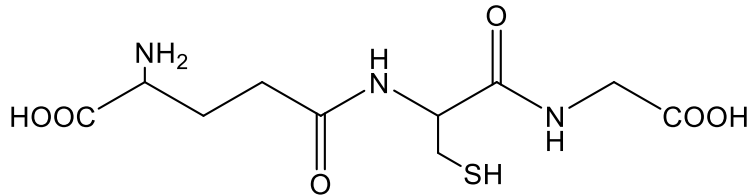
Şekil 3'te yapısı gösterilen biluribin, HEM metabolizmasının son ürünlerindendir. Dolaşım esnasında karaciğer tarafından alınarak biyotransformasyonla, safra veya idrarla dışarı atılır. Antioksidan etkisi; süperoksit ve hidroksil radikalini toplamasıdır (21,22).



Şekil 3. Biluribin yapısı

c. Glutatyon:

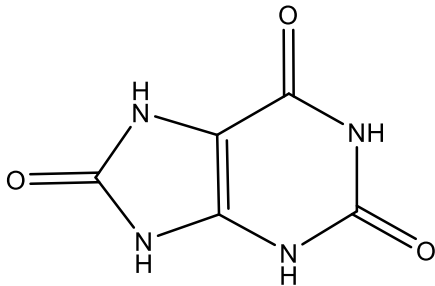
Şekil 4'te yapısı gösterilen glutatyon, karaciğerde sentezlenebilen, suda çözünebilen önemli bir antioksidandır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek, hücreleri oksidatif hasara karşı korur (16).



Şekil 4. Glutatyon yapısı

ç. Ürik Asit:

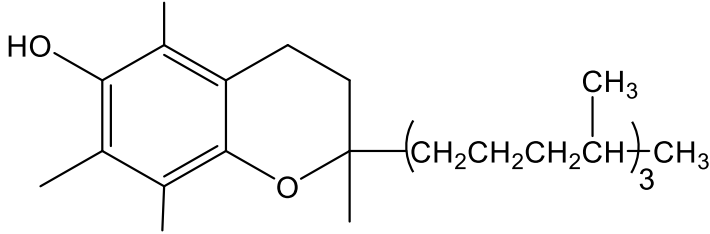
Şekil 5'te yapısı belirtilen ürik asit, purin metabolizmasının son ürünü olup; süperoksiti, peroksit radikallerini, hidroksili ve singlet oksijenini gidererek antioksidan olarak davranır (23).



Şekil 5. Ürik asit yapısı

d. α -tokoferol (E Vitamini):

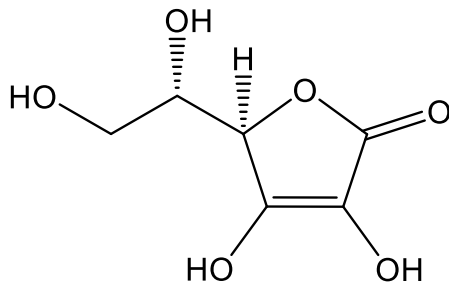
Yağda çözünen bir madde olan α -tokoferol E vitamini ailesinin ana bileşeni olup (Şekil 6), dokularda bulunan, eksojen kaynaklı en önemli lipofilik antioksidandır. E vitamini, serbest radikal ve tekli oksijen tutucu olarak görev yapar (24).



Şekil 6. α -tokoferol (E Vitamini) yapısı

e. Askorbik asit (C Vitamini):

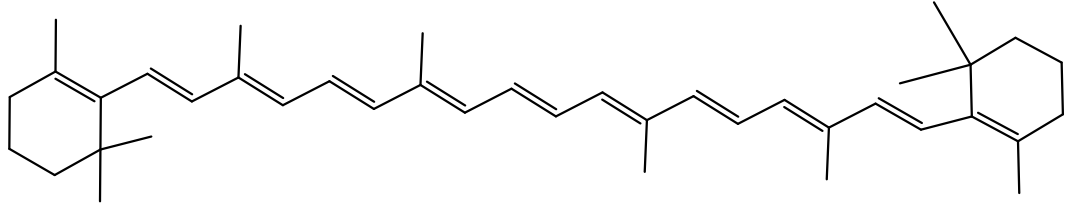
Askorbik asit olarak da adlandırılan C vitamini, taze meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunur (Şekil 7). Güçlü ve suda çözünebilir bir antioksidandır. İnsanlarda, L-glukolakton oksidaz enzim eksikliğinden dolayı C vitaminini sentezleyemez, bu nedenle diyet yoluyla alınması gerekir. C vitamininin, E vitaminini yenileme özelliği de vardır (25).



Şekil 7. Askorbik asidin yapısı

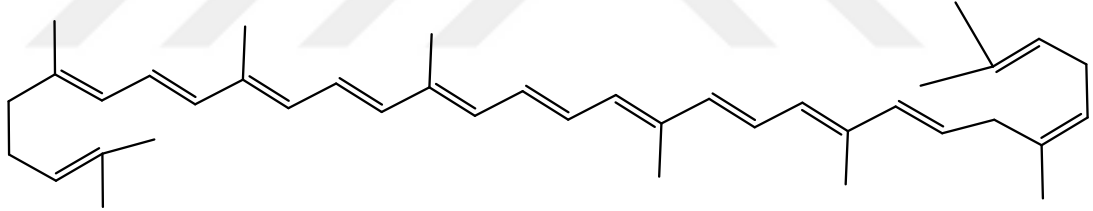
f. Karotenoidler:

Karotenoidler yağda çözünebilir. Taze meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunur. Taze sebze ve meyvelerin sarı, turuncu, kırmızı renkli olmasından sorumludur. A vitamini öncüsü olan β -karoten (Şekil 8) ve likopen en yaygın karotenoittir (26).



Şekil 8. β -karoten yapısı

Likopen, serbest radikalleri etkili bir şekilde temizleyip, in vitro koşullarda H_2O_2 ve NO_2 'yi inaktif hale getirebilmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Likopen yapısı

g. Polifenoller:

Polifenoller birçok meyve ve sebzede bulunan güçlü antioksidanlardır. Polifenollerin antioksidan aktivitesi; serbest radikalleri bağlama kapasitesi veya demiri indirgeme gücüne dayanmaktadır. Polifenoller; fenolik asit ve flavonoidler olarak sınıflandırılmaktadır (24).

1) Fenolik asitler: Aromatik karboksilik asitlerin hidroksi türevleridir. Fenolik asitler; kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik hastalığın başlıca nedeni olan serbest radikallere ve diğer reaktif oksijen türlerine karşı güçlü antioksidan etki göstermektedirler.

2) Flavonoidler: Flavonoidler önemli düzeyde antioksidan ve şelatlama özelliklerine sahiptir. Serbest radikallere karşı antioksidan özellik gösterme, enzim aktivitelerini düzenleme, hücre çoğalmasını inhibe etme, antibiyotik ve antiallerjen özellik taşıma, ishal, ülser ve iltihabı önleyici ilaç gibi görev almalarından dolayı önem taşımaktadırlar.

Antioksidan kapasitesi bakımından en önemli flavanoidler şunlardır:

a) Antosiyaninler: Flavonoid bileşikler arasında yer alırlar. Meyve, sebze ve çiçeklerde bulunurlar. Meyve, sebzelere mavi, kırmızı, mor rengi veren pigmentlerdir. Antosiyaninlerin; antioksidan, antikanser, antidiabetik ve iltihap önleyici olarak sağlığa yararlı özellikleri vardır.

b) Proantosiyanidinler: Meyve, sebze, fındık, tohum, çiçek ve ağaç kabuğunda sıkça bulunurlar. Proantosiyanidinler, serbest radikal temizleyici ve antioksidan aktivite göstermektedirler.

c) Kateşinler (Flavanoller): Kateşinler daha çok çayda, kırmızı şarapta ve çikolatada bulunmaktadır. Başlıca kateşin çeşitleri; (+) kateşin, (-) epikateşin, (+) gallokateşin, (-) epigallokateşindir. Antioksidan, antikanserojen ve obeziteyi önleyici özellik gösterirler.

SENTETİK ANTİOKSİDANLAR

Sentetik antioksidanlar; bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), propil gallatlar (PG), tert-bütıl hidrosikinon (TBHQ), sodyum benzoat gibi bileşiklerdir.

Sentetik antioksidanların gıdalara eklenmesindeki amaçlar; lipid peroksidasyonunu engellemek veya azaltmak, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşumunu engellemek, besin kalitesini sürdürmek, raf ömrünü uzatmaktır.

Gıdalar ve Antioksidanlar

Gıdalarla alınan antioksidanların, insan sağlığı ve yaşam kalitesi üzerinde olumlu etkileri vardır.

Taze sebze ve meyvelerde bulunan doğal antioksidan maddelerin kanser, diyabet, obezite, katarakt ve kardiovasküler hastalıklar üzerinde koruyucu etkisi olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu nedenle vücudun endojen antioksidan savunma sisteminin korunması için diyet yolu ile alınabilecek, farklı doğal kaynaklardan elde edilecek, yeni, etkili ve güvenli antioksidanları keşfetme, bulma çalışmaları oldukça önemli bir yere sahiptir (16).

Çalışmada Kullanılan Meyve ve Genel Özellikleri

Arbutus unedo L. meyvesi, Ericales takımından Ericaceae familyası, Arbutoideae alt familyası ve *Arbutus* cinsine aittir (Şekil 10). Coğrafik olarak çok geniş bir yayılma alanına sahiptir. Genel olarak akdeniz ikliminin olduğu yörelerde, kızılçam ormanlarında ve makilik alanlarda yetiştiği görülmektedir. Ülkemizde; Kocayemiş, Dağ yemişi, Davulga, Yağma, Piridim, Ayı yemişi, Andıra, Dal çileği, Giresun'da Enderek ağacı ve Zefre yemişi olarak isimlendirilmektedir (27).

Akdeniz ülkelerinde, Kuzeybatı ve Orta Amerika'da yayılış göstermekte olup, 12 türü bulunmaktadır. Bunlardan *Arbutus unedo* L. ve *Arbutus andrachne* L. Türkiye florasında doğal olarak yetişmektedir. Bu türler ülkemizde Akdeniz, Ege, Marmara ile Batı Karadeniz kıyılarındaki makilik alanda yetişmektedir.



Şekil 10. Kocayemiş (*Arbutus unedo* L) meyvesi

Anavatanı olarak Anadolu'nun da içinde yer aldığı Yunanistan, Lübnan, İrlanda ve Güney Avrupa Bölgesi gösterilmektedir. Şekil 11'de görüldüğü üzere, olgunlaşmış koyu kırmızı meyveleri yuvarlak çilek görünümünde olup, botanik ve pomolojik olarak ise çilek türü ile aralarında bir benzerlik bulunmamaktadır. İngilizce'de "strawberry tree-çilek ağacı" olarak isimlendirilmektedir.



Şekil 11. Kocayemiş meyveleri

Kocayemiş bitkileri her daim yeşil yapraklı, küçük bir ağaç ya da çalı görünümündedir. Ağaç alçaktan dallanmakta olup, kabukları kırmızı-kızıl kahve renklidir. Genellikle 1,5-3 m yükseklikte olup 9 m'ye kadar büyüebilmektedir. Oldukça lifli bir yapıya sahiptir ve kırılmaya dayanıklıdır. Sürgünleri genelde ince ve kısadır, gençken tüylüdür. Kızıl kahverengi dallar üzerinde sarmal durumda bulunan yaprakları daima yeşildir. Şekil 12'de görüldüğü gibi, yapraklarının üstü parlak koyu yeşil, altı açık yeşil, kenarları keskin testere dişli, ucu sivri mızrak şeklindedir. Yaprığın boyu 4,5-8 cm, genişliği 2-3,5 cm'dir (28,29,30).



Şekil 12. Kocayemiş yaprakları

Kocayemişin çiçekleri beyaz, uç kısımları yeşilimsi veya açık pembe renkli olup, çiçekler 8–9 mm uzunluğunda, beyaz, sıkça pembe veya yeşil renkte olan kokulu, tekrarlanan loblu, çan şeklindedir. Meyveleri, Şekil 11’de görüldüğü gibi, yaklaşık 15-20 mm çapında, 4-8 g ağırlığındadır. Olgun meyveler kırmızı renkte, yuvarlak veya yassı olup dış kabuğu pürüzlüdür. Bazen meyvenin uç kısmında çıkıntılara rastlanır. Meyve tamamen olgunlaştığında, çok özlü tropikal meyve yapısında ve hoş bir lezzete sahip olup yenebilir. Meyvelerin olgunlaşması, yaklaşık 12 ay sürdüğü için, olgun meyve ve çiçekler ağaçta, aynı zamanda bulunur (31,32).

Kocayemiş kurak hava koşullarına dayanmakta, fakir topraklarda da sorunsuz bir şekilde yetişebilmektedir. Çiçeklenme Eylül ayından Mart ayına kadar devam eder. Doğal ortamda bulunan kocayemiş meyveleri, toplanarak taze olarak tüketildiği gibi reçel, marmelat olarak da değerlendirilmektedir (33).

Kocayemişin yüksek oranda C vitamini içermesi, kış aylarında olgunlaşması, yapraklarının sakkaroz ve tanen, arbutin, metilarbutin ve urson gibi fenolik maddeler içermesi, ağaç kabuğu ve köklerinde tanen bulunması kocayemişi önemli kılmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı insan sağlığı için, meyve ve yaprakları alternatif tıpta kullanılmaktadır (32).

Bu bitki ekolojik açıdan da önemli bir rol oynamaktadır. Kocayemiş; faunanın çeşitliliğini korumaya yardımcı olur, toprakların aşınmasını önler, yangınlardan sonra hızla yenilenir, fakir topraklarda yetişir, arsenik kirliliğine karşı filtreleme için kullanılabilir.

Bu tez kapsamında, son yıllarda tanınmaya başlayan kocayemiş bitkisinin meyveleri ile yaprakları *in vitro* koşullarda antioksidan aktivitesi, çeşitli metodlarla incelenmiş ve kocayemiş bitkisinin beslenmemizde ve ilerleyen aşamalarda eczacılık alanında da kullanılabilecek bir doğal antioksidan kaynağı olup olamayacağı değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇ

Bitki Örnekleri

Deneyde kullanılan bitkisel materyal kocayemiş, Çanakkale ilinin Gelibolu ilçesinden Kasım ayında toplandı. Bitkilerin yaprakları ve meyveleri birbirinden ayrıldıktan sonra kurutulup, derin dondurucuda kullanılıncaya kadar bekletildi.

Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, TÜBAP desteği ile Merck ve Sigma-Aldrich'ten satın alındı.

Çalışmalarda;

Analitik terazi:	Shimadzu ATX 224
Çalkalamalı su banyosu:	Wisebath 100-300 rpm, termostatl
Spektrofotometre:	Optizen pop UV/VIS
Evaporatör:	Buchi Rotavapor R II
Etüv:	Bündel ED 115
Su arıtma cihazı:	GFL 2002
Vorteks:	Datman Scientic (VM-10)
pH-metre:	Mettler Toledo Seven Compact S210
Santrifüj:	Awel C12 centriugation
Liyofilizatör:	Hypercool HC3110
LC-MS/MS:	Agilent Technologies 6420 Triple Quad,

Bunlar ile birlikte mikro pipetler ve eppendorflar kullanılan başlıca ekipmanlardır.

Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Kocayemiş meyve ve yaprak çözeltileri:

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları, derin dondurucuda ependorflardan alınarak, çözücüsüne göre etil alkol veya su ile 1000 mg/ml olacak şekilde çözüldü. Daha düşük konsantrasyonlu örnekler, bu stok çözeltiden çözücüsü ile istenilen konsantrasyona uygun olarak, seyreltilerek hazırlandı.

Toplam fenolik bileşik tayini için kullanılan çözeltiler:

% 2'lik Na_2CO_3 Çözeltisi: 2g Na_2CO_3 tartılıp, destile su ile çözüldü. Balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Reaktifi: Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

Gallik Asit: 0,025 g gallik asit tartıldı ve destile su ile 50 mL'ye tamamlandı (500 $\mu\text{g/mL}$). Stok çözeltiden destile su ile seyrelterek, farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler hazırlandı.

Pirokateşol: 0,025 g pirokateşol tartıldı ve destile su ile 50 mL'ye tamamlandı (500 $\mu\text{g/mL}$). Stok çözeltiden destile su ile seyreltilerek, farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler hazırlandı.

Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayini için kullanılan çözeltiler:

2 mM FeCl_2 : 0,0254 gram FeCl_2 tartıldıktan sonra bir miktar destile su ile çözüldü. Destile su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

5mM Ferrozin: 0,0616 gram ferrozin tartılarak, bir miktar destile su ile çözüldü. Destile su ile balon jojede 25 mL'ye tamamlandı.

BHA: 0,025 g BHA tartılıp, bir miktar etil alkol ile çözüldü ve etil alkol ile balon jojede 25 mL'ye tamamlandı (1000 $\mu\text{g/mL}$). Stok çözelti seyreltilerek, 5 farklı derişimde örnek çözelti hazırlandı.

BHT: 0,025 g BHT tartılıp, bir miktar etil alkol ile çözüldü ve etil alkol ile balon jojede 25 mL'ye tamamlandı (1000 $\mu\text{g/mL}$). Stok çözelti seyreltilerek 5 farklı derişimde örnek çözelti hazırlandı.

EDTA sodyum tuzu: 0,025 g EDTA sodyum tuzu tartılıp, bir miktar destile suda çözüldü ve destile su ile balon jojede 25 mL'ye tamamlandı (1000 $\mu\text{g/mL}$). Stok çözelti seyreltilerek 5 farklı derişimde örnek çözelti hazırlandı.

Toplam flavonoid içeriğinin tayini için kullanılan çözeltiler:

% 5'lik Sodyum Nitrit Çözeltisi: 5 g NaNO_2 tartılıp, bir miktar destile su ile çözüldü. Balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı

% 10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi: 10 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ tartılıp, bir miktar destile su ile çözüldü. Balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı

% 4,3'lük NaOH Çözeltisi: 4,3 g NaOH tartılıp, bir miktar destile su ile çözüldü. Balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Gallik asit: 0,0250 g gallik asit tartılıp, etil alkol ile çözüldü. Balon jojede etil alkol ile 25 mL'ye tamamlandı. Stok çözelti seyreltilerek (50-100-150-200-250) $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde hazırlandı.

Kuersetin: 0,0250 g kuersetin tartılıp, etil alkol ile çözüldü. Balon jojede etil alkol ile 25 mL'ye tamamlandı. Stok çözelti seyreltilerek (50-100-150-200-250) $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde hazırlandı.

H_2O_2 giderme aktivitesinin tayini için kullanılan çözeltiler:

0,1 M Fosfat Tamponu ($\text{pH}=7,4$): K_2HPO_4 (17,418 g/L) ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (15,602 g/L) çözeltileri kullanılarak, magnetik karıştırıcı ve pH metre yardımıyla $\text{pH}=7,4$ olacak şekilde tampon çözelti hazırlandı.

40 mM H_2O_2 Çözeltisi: 0,409 mL H_2O_2 alınıp, 0,1 M fosfat tamponu ($\text{pH}=7,4$) ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

Süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesinin tayini için kullanılan çözeltiler:

0.1 M Fosfat Tamponu ($\text{pH}=7,4$): KH_2PO_4 (13,609 g/L) ve Na_2HPO_4 (14,196 g/L) çözeltileri kullanılarak, magnetik karıştırıcı ve pH metre yardımıyla $\text{pH}=7,4$ olacak şekilde tampon çözelti hazırlandı.

156 μM NBT (Nitrotetrazoliumblue klorür) Çözeltisi: 0,0128 g NBT tartılıp, 0,1 M fosfat tamponunda ($\text{pH}=7,4$) çözüldü. Balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

468 μM NADH (Nikotin amid adenin di nükleotid) Çözeltisi: 0,0310 g NADH tartılıp 0,1 M fosfat tamponunda ($\text{pH}=7,4$) çözüldü. Balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

60 μM PMS (Phenozinemetha sülfat) Çözeltisi: 0,0018 g PMS tartılıp, 0,1 M fosfat tamponunda ($\text{pH}=7,4$) çözüldü. Balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

DPPH• radikali giderme aktivitesinin tayini için kullanılan çözeltiler:

1 mM DPPH Çözeltisi: 0,01972 g DPPH (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) tartılıp, etanolde çözüldü ve balon jojede 50 mL'ye tamamlandı (Günlük hazırlanarak ve karanlık ortamda korundu). 1 mM DPPH çözeltisi stok çözelti olarak hazırlandı. Deneyde kullanılacak çözelti hacmine göre stok çözeltiden alınarak, etil alkol ile seyreltildi ve 0,1 mM DPPH çözeltisi hazırlandı.

ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesinin tayini için kullanılan çözeltiler:

7 mM ABTS Çözeltisi: 96 mg ABTS tartılıp, 25 mL destile suda çözüldü (Günlük hazırlandı).

2,45 mM Potasyum persülfat çözeltisi: 16,6 mg potasyum persülfat tartılıp 25 mL destile suda çözüldü.

0,1 M Fosfat Tamponu (pH=7,4): KH_2PO_4 (13,609 g/L) ve Na_2HPO_4 (14,196 g/L) çözeltileri kullanılarak, pH=7,4 olacak şekilde magnetik karıştırıcı ve pH metre yardımı ile tampon çözelti hazırlandı.

α -tokoferol Çözeltisi: 0,025 g α -tokoferol tartılıp, bir miktar etil alkol ile çözüldü ve etil alkol ile balon jojede 25 mL'ye tamamlandı (1000 $\mu\text{g/mL}$). Stok çözelti seyreltilerek 5 farklı derişimde örnek çözelti hazırlandı.

BHA: 0,025 g BHA tartılıp, bir miktar etil alkol ile çözüldü ve etil alkol ile balon jojede 25 mL'ye tamamlandı (1000 $\mu\text{g/mL}$). Stok çözelti seyreltilerek 5 farklı derişimde örnek çözelti hazırlandı.

BHT: 0,025 g BHT tartılıp, bir miktar etil alkol ile çözüldü ve etil alkol ile balon jojede 25 mL'ye tamamlandı (1000 $\mu\text{g/mL}$). Stok çözelti seyreltilerek 5 farklı derişimde örnek çözelti hazırlandı.

Toplam ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin tayini için kullanılan çözeltiler:

% 1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ Çözeltisi: 1 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ tartılıp, destile suda çözüldü ve balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk TCA Çözeltisi: 10 g Trikloroasetik asit tartılıp, destile suda çözüldü ve balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 0,1'lik FeCl_3 Çözeltisi: 0,1 g FeCl_3 tartılıp, destile suda çözüldü ve balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,2 M Fosfat Tamponu (pH=6,6): K_2HPO_4 17,418 g tartıldı. Bir miktar destile suda çözüldü. Balon jojede destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 15,602 g tartılıp bir miktar destile suda çözüldü, destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler kullanılarak, magnetik karıştırıcı ve pH metre yardımıyla pH=6,6 olacak şekilde tampon çözelti hazırlandı.

Linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile toplam atioksidan aktivite tayini için kullanılan çözeltiler:

0.04 M Fosfat Tamponu (pH=7,0): 3,4896 gram K_2HPO_4 tartılıp, bir miktar destile suda çözüldü. Balon jojede destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. 3,1204 gram $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tartılıp, bir miktar destile suda çözüldü. Balon jojede destile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Bu iki çözelti kullanılarak, magnetik karıştırıcı ve pH metre yardımı ile 0,04 M pH=7 olacak şekilde fosfat tamponu hazırlandı.

Linoleik Asit Emülsiyonu: 350 mg Tween-20 ve 310 µL linoleik asit karışımı balon jojeye alındı. Çözelti balon jojede, fosfat tamponuyla (0,04 M, pH=7,0) 100 mL'ye tamamlanıp, hazırlandı.

% 75'lik Etanol Çözeltisi: 390,6 mL saf etil alkol alınıp, destile su ile balon jojede 500 mL'ye tamamlandı.

% 30'luk NH_4SCN Çözeltisi: 30 g NH_4SCN tartılıp, bir miktar destile suda çözüldü, balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 3,5'luk HCl Çözeltisi: 7,88 mL der. HCl (%37'lik) çözeltisinden pipetle alındı. İçinde bir miktar destile su bulunan 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Balon jojede destile su ile 100 mL ye tamamlandı.

20 mM $FeCl_2$ Çözeltisi: 0,2535 g $FeCl_2$ tartılıp, %3,5'luk HCl çözeltisi ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

KULLANILAN YÖNTEMLER

Ekstraktların Hazırlanışı

Derin dondurucuda saklanan kurutulmuş kocayemiş meyve ve yaprakları ayrı ayrı öğütücü yardımıyla öğütülerek homojenize hale getirilip, etil alkol ve su çözücüleri kullanılarak ekstraktlar hazırlandı.

Etil alkol ekstraksiyonu için 25'er g meyve ve yaprak örneği 500 mL çözücü içinde oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda 150-200 rpm'de 3 saat inkübe edildi. Elde edilen ekstraktlar, süzgeç kâğıdın da süzüldü ve süzüntülerin çözücüleri evaporatörde 40°C-50°C' de uçuruldu.

Su ekstraksiyonu için 25 g meyve örneği 100 °C'ye ısıtılmış 500 mL suda, 30 dk boyunca karıştırıldı. Elde edilen su ekstraktı süzgeç kâğıdından süzüldü ve süzöntü liyofilize edildi.

Ekstrelerin susuz kalıntıları 0.01 g'lık porsiyonlara ayrılarak eppendorflara konularak, kullanılıncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

Toplam Fenolik Bileşik Tayini

Kocayemiş meyvesinin su ve etil alkol ekstraktları ile kocayemiş yaprağının etil alkol ekstresinde bulunan toplam fenolik madde içerikleri Slinkard ve Singleton tarafından modifiye edilen Folin-Ciocalteu metoduna (FCR) göre belirlenmiştir (34). FC reaktifi fosfotungustik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımıdır. Fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile doğru orantılı olup 760 nm'de spektrofotometrede takip edilir.

Kocayemiş meyvesinin, 1000 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ekstraktlarından 1'er mL alındı. Destile suyla hacimler 46 mL'ye tamamlandıktan sonra 1 mL Folin-Ciocalteu belirteci eklendi. 3 dakika sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 3 mL ilave edilip, 2 saat çalkamalı su banyosunda 25°C ve 150 rpm'de inkübe edildi. Destile su içeren şahit denemeye karşı, 760 nm'de absorbanslar ölçüldü.

100-200-300-400-500 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanan gallik asit ve pirokateşol standart çözeltileri için de aynı sıra ve miktarda madde ilaveleri ve aynı çalışma yapıldı. Standartların da destile su içeren şahit denemeye karşı, 760 nm'de absorbansları ölçüldü.

Standart çözeltilerin okunan absorbansı ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden faydalanılarak, meyve ve yaprak ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları mg/g olarak hesaplandı.

Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Metal iyonları şelatlama aktivitesi tayini, serbest halde bulunan ağır metallerin yıkıcı etkilerini yok etmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Kocayemiş meyve su ve etil alkol ekstraktlarının, metal şelatlama aktivitesi Rival ve ark. (35) ile Duh ve ark. (36)'nın uyguladığı yöntemler temel alınarak uygulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlardaki, Fe^{2+} iyonlarını şelatlama özelliği olan antioksidan maddeler, serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirir, böylece fenton reaksiyonları sonucu oluşan hidroksil ve peroksit gibi radikal oluşumunu inhibe ederler. Reaksiyon ortamında bulunan Fe^{2+} iyonlarını bağlamak için ekstraktların, ferrozin ile yarışmada olduğu bir yöntemdir. Bu yöntemde azalan absorbans metal iyonlarının şelatlandığının bir göstergesidir. Bu amaçla $FeCl_2$ çözeltisi kullanılmıştır. Fe^{+2} iyonu ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin 562 nm de mor renk oluşturmaya dayanılarak şelatlama aktivitesi belirlenmiştir (35,36).

50-100-150-200-250 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanan, seyreltilmiş kocayemiş meyve örneklerinin, 1 mL' sine 3,7 mL %96'lık etil alkol ilave edildi. Her bir örneğe 2mM $FeCl_2$ çözeltisinden 0,1 mL ilave edilerek, vorteksle karıştırıldı. 60 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. 60 dakika sonunda, 0,2 mL 5 mM ferrozin eklenerek vorteksle karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Örnek ve standartların absorbansı, şahit olarak etil alkole karşı 562 nm de ölçüldü.

Kontrol; 4,7 mL etil alkol, 0,1 mL $FeCl_2$ ve 0,2 mL ferrozin içermektedir. Standart olarak EDTA, BHA ve BHT kullanıldı. Standartlarda 5 farklı konsantrasyonda (50-100-150-200-250 $\mu g/mL$) hazırlandı. Kocayemiş meyve su ve etil alkol ekstraktlarına uygulanan işlemler sırasıyla standartlara da uygulandı. Süre sonunda her bir standartın absorbansı, şahit olarak kullanılan etil alkole karşı 562 nm'de okundu. Aşağıdaki denkleme göre % metal şelatlama etkisi değeri hesaplandı.

$$\text{Metal şelatlama (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} : Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$: Örnek ya da standartların absorbansı

Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini

Kocayemiş ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid madde içeriğı, Zihishan ve ark. (37) tarafından uygulanmış metoda gore belirlendi.

Kocayemiş meyve ile yapraklarının, 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su ve etil alkol ekstraktlarından 10 mL alındı. zerine 1 mL %5'lik sodyum nitrit ilave edilerek, karıştırıldı ve 6 dk bekletildi. Flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturmak için 1 mL %10'luk alüminyum nitrat eklendi ve karıştırıldı. 6 dk sonra 10 mL %4,3'lük NaOH ilave edildi ve toplam hacim destile su ile 25 mL'ye tamamlanarak, iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 15 dk sonra ozeltinin absorbansı, şahit olarak kullanılan destile suya karşı 510 nm'de ölçüldü.

Standart olarak kullanılan gallik asit ve kuersetin ozeltileri 50-100-150-200-250 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı. Gallik asit ve kuersetin ozeltilerine de bu işlemler sırası ile uygulandı. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden, örneklerin toplam flavonoid madde miktarları mg gallik asit/g meyve-yaprak ekstrakt ve mg kuersetin/g meyve-yaprak ekstrakt olarak tanımlandı.

H₂O₂ Giderme Aktivitesinin Tayini

Kocayemiş meyve ekstraktlarının, hidrojen peroksit giderme yeteneğı Ruch ve ark. (38) metoduna gore çalışıldı. Bu metotta, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit ozeltisinin bitki ekstraktı tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle izlenir.

100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan bitki ve standart ozeltilerinden deney tüplerine 1 mL alındı. Üzerlerine 2,4 mL fosfat tamponu (0,1 M pH=7,4) ve 0,6 mL H₂O₂ (40 mM) ozeltisi eklendikten sonra vortekslendi. Oda koşullarında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

Ayrıca her bir bitki ve standart örneğı için ayrı ayrı, 1 mL örnek ve 4 mL fosfat tamponundan oluşan ve H₂O₂ içermeyen numune krleri hazırlandı. Oda koşullarında 30 dakika inkübe edildi.

Kontrol olarak, 3,4 mL fosfat tamponu (0,1 M pH=7,4) ve 0,6 mL H₂O₂ ozeltisi (40 mM) kullanıldı. Oda koşullarında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Kontrol için kr olarak destile su kullanıldı.

30 dakika süre sonunda açık renk ozeltilerin absorbansları, hazırlanan krlere karşı 230 nm'de ölçüldü. Standart olarak BHA, BHT ve α tokoferol kullanıldı.

Bitki ekstraktlarının ve standartların H₂O₂ giderme aktivitesi %'si, aşağıdaki denklem kullanılarak belirlendi.

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ giderme aktivitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartların absorbansı

Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini

Kocayemiş ekstraktlarının, süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesi, Nishimiki M. ve ark. (39)'nın belirlediği metoda göre nitrobluetetrazolium ürününün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi. Deney koşullarında NADH/PMS/O₂ sistemi ile üretilen süperoksit radikali sarı renkli olan NBT'yi mavi-mor renkli formazon türevine indirger. Süperoksit radikalini gideren bileşiklerden dolayı düşük absorbans değerleri elde edilir.

1 mL 156 µM NBT çözeltisine (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) ve 1 mL 468 µM NADH çözeltisi (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) eklendi. Ardından 1 mL ekstrakt veya standart eklenerek vorteksle karıştırıldı. Karışıma 100 µL, 60 µM PMS çözeltisi (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Karışım 25 °C'de 5 dk inkübe edildi ve absorbansı kör olarak kullanılan destile suya karşı 560 nm'de ölçüldü.

Standart olarak α-tokoferol, BHA ve BHT kullanıldı. Kontrol çözeltisine ekstraktlar yerine 1 mL su ilave edilerek aynı işlemler yapıldı. Ekstraktlar ve standartlar 50-200 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Aşağıdaki denkleme göre % inhibisyon değerleri hesaplandı.

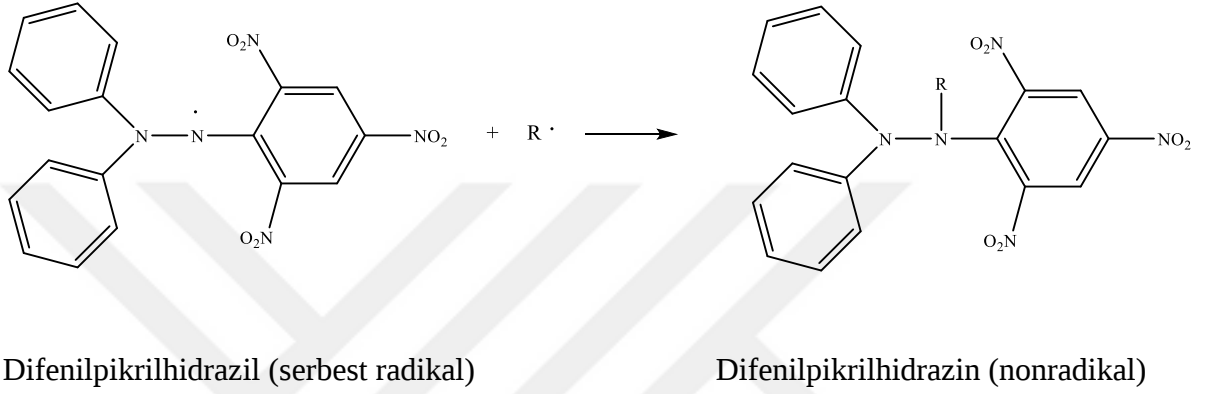
$$\text{Süperoksit anyon Radikali Giderme Aktivitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartların absorbansı

DPPH• Radikalı Giderme Aktivitesinin Tayini

DPPH serbest radikali giderme aktivitesi, DPPH• (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) radikali kullanılarak Blois'in metoduna göre çalışıldı (40). Metod ekstraktların bir proton veya bir elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin renginin sarıya doğru açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin bir göstergesidir (41,42).



Şekil 13. DPPH radikalinin indirgenmesi (43).

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartlarının, 50-150-250 µg/mL konsantrasyonlarında üç farklı çözeltisi hazırlandı. Farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt ve standart çözeltilerden 3'er mL alınarak, üzerlerine 1 mL 0,1 mM DPPH eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 25 °C'de, karanlıkta 30 dk bekletildi. Absorbansları 517 nm'de kör olarak etil alkol kullanılarak okundu.

Kontrol olarak 3 mL etil alkol ve 1 mL 0,1 mM DPPH çözeltisi kullanıldı. Standart olarak BHA, BHT, α-tokoferol kullanıldı. Aşağıdaki denkleme göre % DPPH radikali giderme aktivitesi hesaplandı.

$$\text{DPPH radikali giderme aktivitesi \%} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartların absorbansı

ABTS•⁺ Radikalı Giderme Aktivitesinin Tayini

Kocayemiş ekstraktlarının ABTS•⁺ radikalı giderme aktivitesi Yong ve ark. (44) tarafından uygulanan metoda göre belirlendi. Antioksidan aktivitenin taranması için uygulanan bu yöntem, flavonoidler, hidroksisinamatlar, karotenoidler ve plazma antioksidanlar dahil olmak üzere hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlara uygulanabilen bir renk giderici tahlil olarak kullanılır. 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) 'in önceden oluşturulmuş radikalı (ABTS •⁺), ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu ile üretilir ve bu tür, hidrojen veren antioksidanların varlığında indirgenir (44). Çalışmada temel olarak, ABTS çözeltisine, bitki ekstresi veya standart çözelti ilavesinden sonra, bitki veya standart çözelti bulunduran antioksidanların, ABTS radikal katyonunu, inhibisyonu nedeni ile belli bir yüzdede yok etmekte ve absorpsiyon da azalmaktadır.

ABTS radikalı giderme deneyinin yapılışında, 7 mM ABTS çözeltisi ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltilerinden 25'er mL karıştırılıp, 12-16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilerek, mavi-yeşil renk ABTS•⁺ radikalı çözeltisi elde edildi. Kullanılmadan önce, ABTS çözeltisinin absorpsiyonu, 0.1 M fosfat tamponuyla (pH=7.4), 734 nm'de 2,00±0.025 olacak şekilde seyreltilir. Bu çözelti günlük olarak hazırlanır.

1 mL ABTS çözeltisine farklı derişimlerde (50-100-150-200-250 µg/mL) hazırlanan 3 mL meyve ve yaprak ekstraktları eklendi. Oda şartlarında, 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra 734 nm'de saf suya karşı absorpsiyonları okundu. Aynı işlemler standart olarak kullanılan; BHA, BHT ve α-tokoferol çözeltileri içinde uygulandı. Kontrol olarak, 1 mL ABTS ve 3mL etil alkol kullanıldı.

Bitki ekstraktlarının ve standartların ABTS giderme aktivitesi, aşağıdaki denklem kullanılarak belirlendi.

$$\text{ABTS Radikal Giderme Aktivitesi(\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün absorpsiyonu

$A_{\text{örnek}}$ = Örnek ya da standartın absorpsiyonu

Toplam Ferrik İyonlarını (Fe^{3+}) İndirgeme Kapasitesinin Tayini

Demir, organizmada, oksijen taşınması ve oksido-redüksiyon tepkimelerinde görevlidir. Vücutta, demirin (Fe^{2+}) büyük çoğunluğu hemoglobin ve miyoglobinde hem grubunda bulunur. Vücuda diyetle alınan demir; besinlerde Fe^{2+} ve Fe^{3+} şeklinde bulunur. Serbest demirin, çok düşük konsantrasyonları bile toksik etki gösterir. Serbest demirin en ciddi toksisitesi, fenton reaksiyonları ile hidroksil radikalini meydana getirdiği için son derece zararlıdır (45). Kocayemiş numune ve standartların toplam indirgeme kapasitesi tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (46). Bu yöntemle göre ortamdaki indirgen madde, Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeyerek FeCl_3 ilavesiyle oluşan Prusya mavisi renginde olan kompleksin absorbansı, 700 nm’de UV-Görünür Alan Spektrofotometresinde ölçülür. Karışımın absorbansındaki artış, numunenin indirgeme gücü ile doğru orantılıdır. Yani, yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin bir göstergesidir (47).

1 mL ekstrakta veya standarta, 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH=6,6) ve 2,5 mL %1’lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ eklenerek, vortekslendi. Karışım su banyosunda 50 °C’de 20 dk inkübe edildikten sonra 2,5 mL %10’luk TCA eklendi ve 2000 rpm’de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası çözeltinin üst tabakasından 2,5 mL alınarak, üzerine 2,5 mL destile su ve 0,5 mL %0,1’lik FeCl_3 çözeltisi ilave edildi. Çözelti vortekslenerek karıştırıldı. 700 nm’de kör olarak kullanılan fosfat tamponuna karşı absorbanslar ölçüldü. Standart olarak BHA, BHT ve α - tokoferol kullanıldı.

Karotenoid Tayini

Kocayemiş meyvesindeki karotenoid içeriğinin tayini Alasalvar ve ark. (48) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek yapıldı.

500 mg kuru kocayemiş meyve örneği öğütücü ile küçük parçalara ayrıldı. Numune aseton-su (9:1 v/v) karışımının 5 mL’si ile ekstrakte edildi. Meyve ekstresi, 10 dk 3000 rpm’de santrifüjlendi. Açık renkli süpernatant alındı, karanlıkta 4 °C’de bekletildi. Kalan çökelek, 3 mL aseton-su (9:1 v/v) karışımı ile ekstrakte edildi. İşlem renksiz oluncaya kadar (5-6 kez) tekrarlandı.

Ekstraktlar birleştirildi. Ekstraktların şahit asetona karşı 471 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Aşağıdaki denkleme göre toplam karotenoid madde miktarının % değeri hesaplandı.

Toplam Karotenoid İçeriği (%): $\text{Amax} \times 25\text{ml aseton} \times 100 / \text{örnek ağırlığı (mg)}$

Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

FTC metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde, linoleik asit oksidasyonu oluşturularak oksidasyon sonucu oluşan peroksitleri ölçme temeline dayanır. Belirli zaman aralıkları ile inkübasyondaki karışımdan örnekler alınıp spektrofotometrik ölçüm yapılır ve peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder. Analiz Mitsuda ve ark. (49) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Yöntemde oluşan peroksitler Fe^{2+} iyonlarını Fe^{3+} 'e yükseltir. Oluşan Fe^{3+} tiyosiyanat ile reaksiyona girerek 500 nm'de maksimum renge sahip (açık kırmızı tonlar) bir kompleks oluşturur.

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standart çözeltilerin 1 mL'sine 1,5 mL fosfat tamponu (0,04 M, pH=7.4) ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu eklenerek çözeltiler vorteksle karıştırıldı. Sonra çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 50 rpm'de karanlıkta inkübe edildi.

12 saat sonra, farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 0,1'er mL alınıp üzerine 3,7 mL %75'lik etil alkol ve 0,1 mL %30'luk NH_4SCN eklendi. Çözeltiler vorteksle karıştırıldı. 3 dk sonra reaksiyon karışımlarına 0,1 mL $FeCl_2$ (20 mM) çözeltisi eklendi. Vorteksle karıştırıldı. 5 dk sonra oluşan rengin absorbansı, kör olarak destile suya karşı 500 nm'de okundu. Bu okumalar 12 saat ara ile tekrarlandı.

Kontrol olarak, antioksidan madde içermeyen 2,5 mL fosfat tamponu (0,04 M, pH=7) ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. Kontrol de çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 50 rpm'de karanlıkta inkübe edildi. Ekstraktlar ve standart çözeltilere uygulanan işlemler kontrol için de aynı sıra ile uygulandı. Kontrolün absorbansı da kör olarak destile suya karşı 500 nm'de okundu. Bu okumalar 12 saat ara ile tekrarlandı.

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları 50-150-250 µg/mL konsantrasyonlarda, standart çözeltileri de 250 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Standart olarak BHA, BHT ve α-tokoferol kullanıldı.

$$\text{Lipid peroksidasyonu inhibisyonu (\%)} = [1 - (A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}})] \times 100$$

A_{kontrol} = Kontrolün maksimuma ulaştığı inkübasyon anındaki verdiği absorbans değerini

$A_{\text{örnek}}$ = Kontrol değerinin maksimuma ulaştığı inkübasyon anındaki ekstrakt ya da standartların verdiği absorbans değerini ifade eder.

Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Yöntemi ile Fenolik Madde Analizi

Kromatografi bir karışım içerisindeki bileşikleri birbirinden ayırmak ve maddeleri saflaştırmak için kullanılan bir yöntem olup amacı, hedef numunenin ayrımının yapılması ve miktarının ölçülmesidir. Bu yöntem, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Farklı alanlarda ve çeşitli yöntemlerle kullanılan kromatografinin en önemli, etkin ve yaygın kullanım alanına sahip olanı ise Likit Kromatografi temeline dayanan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) cihazlarıdır (50).

LC-MS/MS sıvı kromatografi temeline dayanan bir yöntem ve cihazdır. Çalışmalarda metot yazarken HPLC-UV, HPLC-FLD, HPLC-MS şeklinde gösterimlere rastlanabilir. Aslında LC-MS/MS cihazını HPLC cihazının bir alt türü gibi tanımlayabiliriz. Fakat kütle dedektörünün yüksek özellikleri sayesinde farklı bir yöntem veya cihaz olarak anılmaktadır.

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek ölçme esasına göre çalışan cihazlardır.



Şekil 14. LC-MS/MS(Agilent Technologies 6460 Triple Quad)

Çalışmada Şekil 14’te görülen LC-MS/MS (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/ Sıralı Kütle Spektrofotometresi) cihazı kullanılmıştır. Yöntem TUTAGEM tarafından çalışılmıştır. Çalışmada Bayram N. ve ark. (51) tarafından geliştirilen metod kullanılmıştır.

Çalışmada LC-MS/MS yöntemi, kullanılan standart maddeler yardımıyla, analizi yapılan kocayemiş meyve-su /meyve-alkol/ yaprak-alkol örneklerinin, hangi fenolik bileşikleri içerdiği ve bunların miktarlarını tayin etmede kullanılmıştır.

İstatistik Analizler

Yapılan tüm deneylerde üç paralel ölçüm alınarak, standart sapmalar hesaplandı. İstatistik değerler ve grafikler Windows 10 Excel ve SPSS 25 Paket Programı kullanılarak hazırlanmıştır.



BULGULAR

Kocayemiş meyvesi için etil alkol ve su ekstraktlarının, kocayemiş yaprağı için etil alkol ekstraktının antioksidan özellikleri, çeşitli metodlar uygulanarak, incelendi.

Kocayemiş meyvesiyle hazırlanan su ve etil alkol ekstraktlarında bileşiklerin verimleri kurutulmuş ekstrakt cinsinden sırasıyla 483,44 ve 305,44 mg/g olarak, yaprağı ile hazırlanan etil alkol ekstraktının veriminin 156,32 mg/g olarak hesaplandı. Tablo 2’de görüldüğü üzere en yüksek verimin kocayemiş-su ekstraktında olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 2. Kocayemişin ekstrakt verimleri

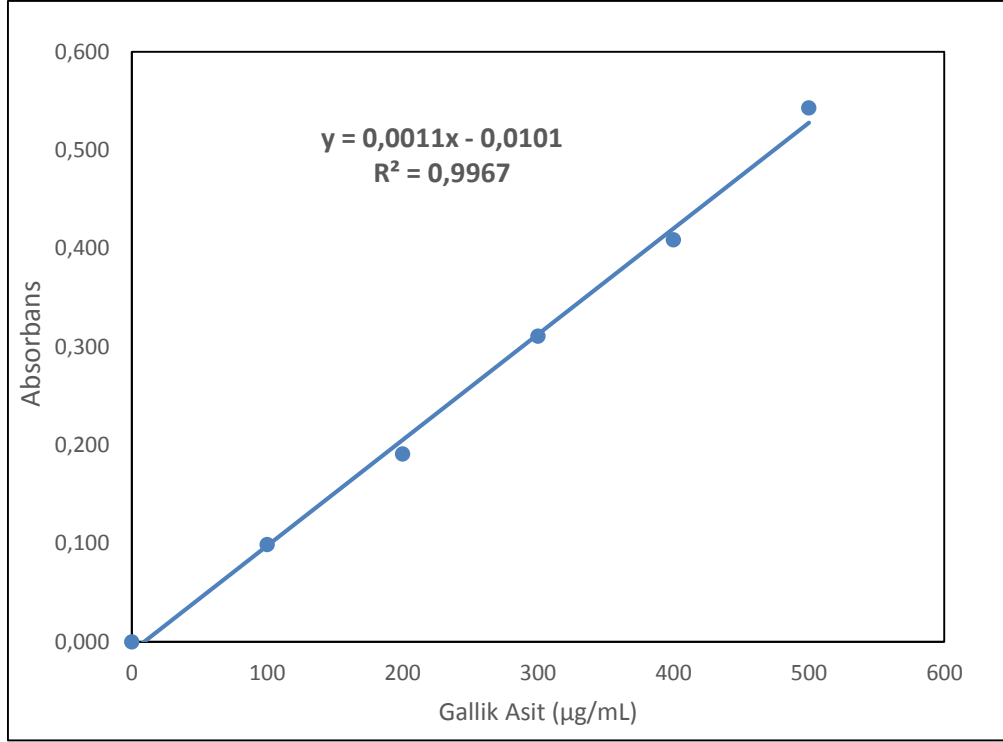
Ekstrakt	Meyve-Su	Meyve-Etil alkol	Yaprak-Etil alkol
Ham Madde (g)	25	25	25
Ekstraksiyon Verimi (mg/g)	483,44	305,44	156,32
Ekstraksiyon Verimi (%)	48,344	30,544	15,632

TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK (TPC) TAYİNİ

Kocayemiş meyvesinin, etil alkol ve su ekstraktları ile kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktında bulunan, toplam fenolik madde miktarının tayini için Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanıldı. Bu yöntemle göre ekstraktların içerdiği toplam fenolik madde miktarını belirlemek için gallik asit ve pirokateşol grafikleri hazırlandı.

Şekil 15'teki gallik asit standart grafiğinden elde edilen formül kullanılarak, kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının içerdiği, toplam fenolik madde miktarları, gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak belirlendi.

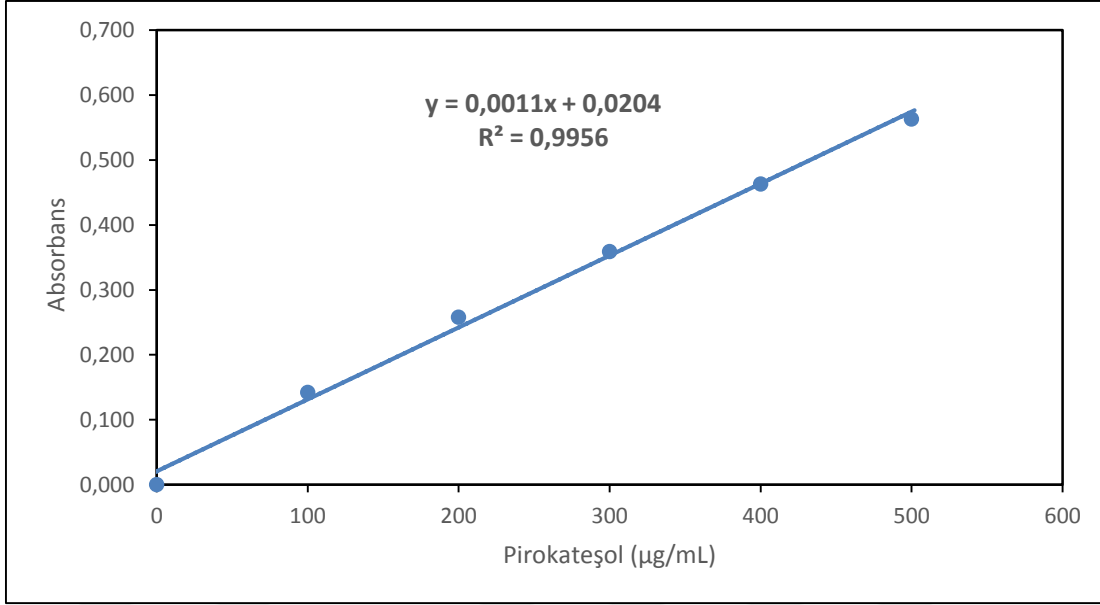
$$\text{Absorbans}_{(760\text{ nm})} = 0,0011 [\text{Gallik Asit}] - 0,0101$$



Şekil 15. Gallik asit standart grafiği

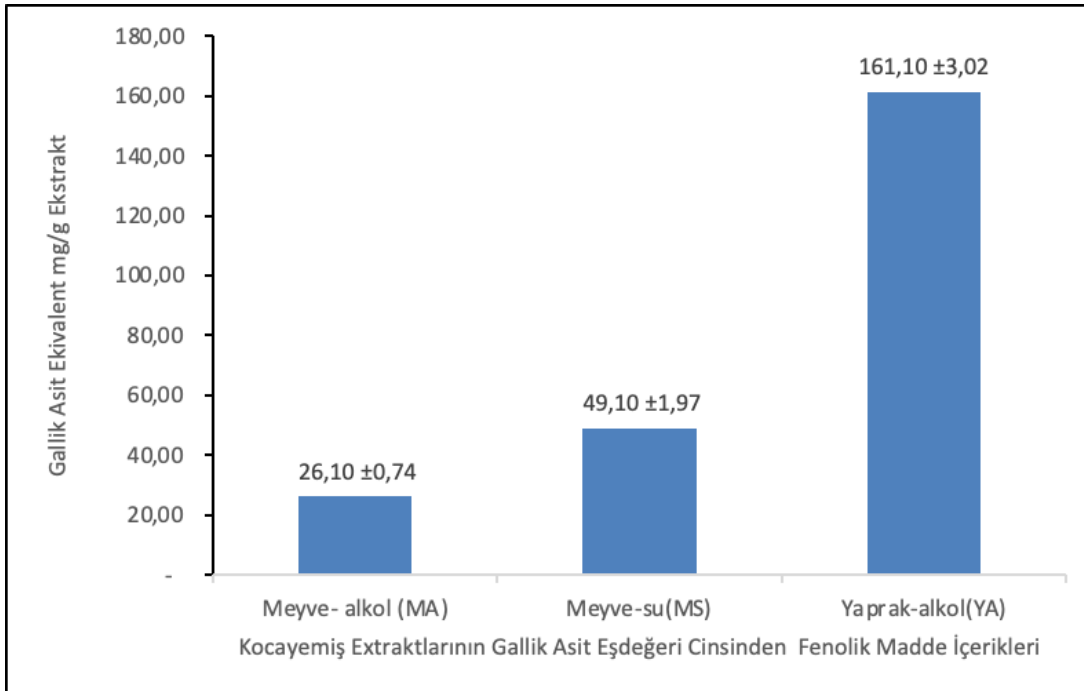
Şekil 16'daki pirokateşol standart grafiğinden elde edilen formül kullanılarak, kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının içerdiği, toplam fenolik madde miktarları, pirokateşol eşdeğeri (PKE) olarak saptandı.

$$\text{Absorbans}_{(760\text{nm})} = 0,0011 [\text{Pirokateşol}] + 0,0204$$



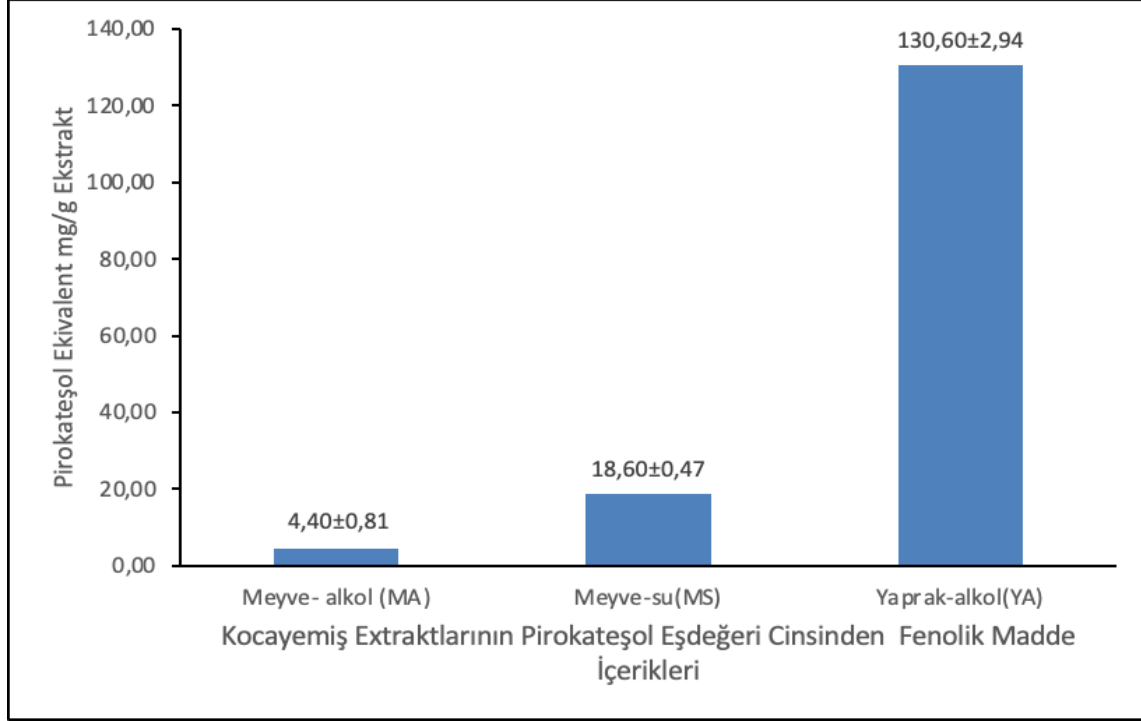
Şekil 16. Pirokateşol standart grafiği

Şekil 17.'de görüldüğü gibi kocayemiş meyvesinin etil alkol ekstraktının $26,10 \pm 0,74$ mg/g, su ekstraktının $49,10 \pm 1,97$ mg/g ve yaprağının etil alkol ekstraktının ise $161,10 \pm 3,02$ mg/g gallik asit eşdeğeri olarak fenolik madde bulundurduğu belirlendi.



Şekil 17. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik madde içerikleri

Şekil 18.'te görüldüğü gibi kocayemiş meyvesinin etil alkol ekstraktının $4,40 \pm 0,81$ mg/g, su ekstraktının $18,60 \pm 0,47$ mg/g ve yaprağının etil alkol ekstraktının $130,60 \pm 2,94$ mg/g pirokateşol eşdeğeri olarak fenolik madde içerdiği belirlendi.



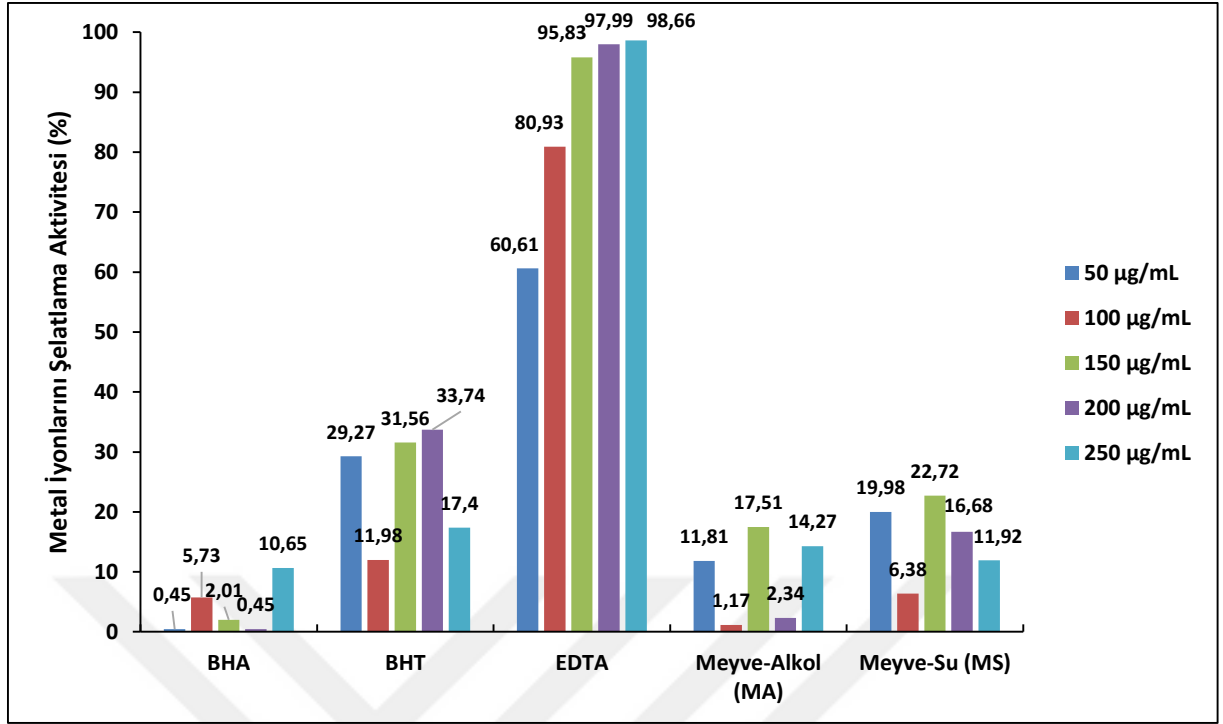
Şekil 18. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının pirokateşol eşdeğeri olarak fenolik madde içerikleri

Standart grafikler yardımıyla gallik asit eşdeğeri olarak kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının içerdiği fenolik madde miktarlarının, $26,10 \pm 0,74$ - $161,10 \pm 3,02$ mg/g ve pirokateşol eşdeğeri olarak $4,40 \pm 0,81$ - $130,60 \pm 2,94$ mg/g arasında değiştiği belirlendi (Şekil 17 ve Şekil 18).

DEMİR (II) İYONLARINI ŞELATLAMA AKTİVİTESİ

Kocayemiş meyve ve yapraklarının Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesi, standart olarak EDTA, BHA ve BHT kullanılarak belirlendi (Şekil 19).

Şekil 19' daki grafikten de anlaşılacağı üzere, kocayemiş meyve ekstraktlarının, metal şelatlama kapasitesinin konsantrasyona bağlı olmadığı gözlemlendi.



Şekil 19. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri (%)

Tablo 3'te görüldüğü üzere, standartlarda EDTA'nın tüm konsantrasyonlarda metal şelatma aktivitesinin yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 3. Standartların farklı konsantrasyonlarının Demir (II) iyonlarını şelatlama kapasiteleri (%)

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
BHA	%0,45±0,02	%5,73±0,13	%2,01±0,45	%0,45±0,06	%10,65±0,28
BHT	%29,27±0,74	%11,98±0,57	%31,56±0,88	%33,74±0,46	%17,4±0,13
EDTA	%60,61±0,93	%80,93±0,49	%95,83±0,84	%97,99±0,73	%98,66±0,21

Tablo 4'te görüldüğü üzere Kocayemiş meyve ekstraktlarının 50-200 µg/mL konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla MS>MA olduğu, 250 µg/mL konsantrasyonda ise MA>MS olduğu belirlendi.

Tablo 4. Kocayemiş meyve ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının Demir (II) iyonlarını şelatlama kapasiteleri (%)

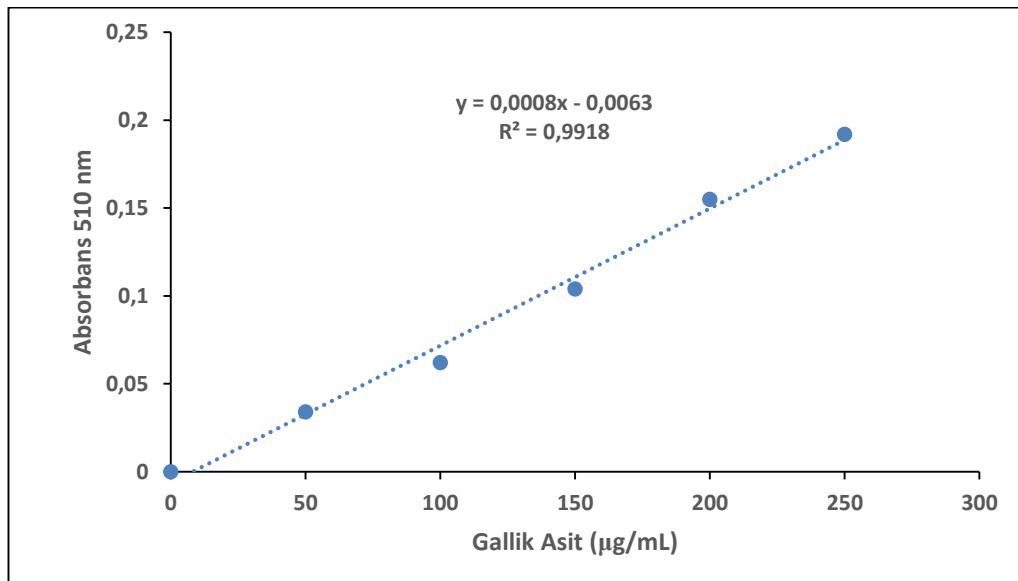
Kocayemiş ekstraktlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
Meyve-Alkol (MA)	%11,81±0,23	%1,17±0,08	%17,51±0,24	%2,34±0,06	%14,27±0,04
Meyve-Su (MS)	%19,98±0,67	%6,38±0,54	%22,72±0,31	%16,68±0,49	%11,92±0,23

TOPLAM FLAVONOİD İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

Kocayemiş meyvesinin etil alkol ve su ekstraktları ile kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktındaki toplam flavonoid içeriğini belirlemek amacıyla gallik asit ve kuersetin kullanıldı. Gallik asit ve kuersetin standart grafikleri oluşturuldu (Şekil 20 ve Şekil 21). Ekstraktların içerdiği toplam flavonoid miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) ve kuersetin eşdeğeri (QUE) cinsinden belirlendi.

Şekil 20'de gallik asit standart grafiği denklemi $y = 0,0008x - 0,0063$ olarak bulundu. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

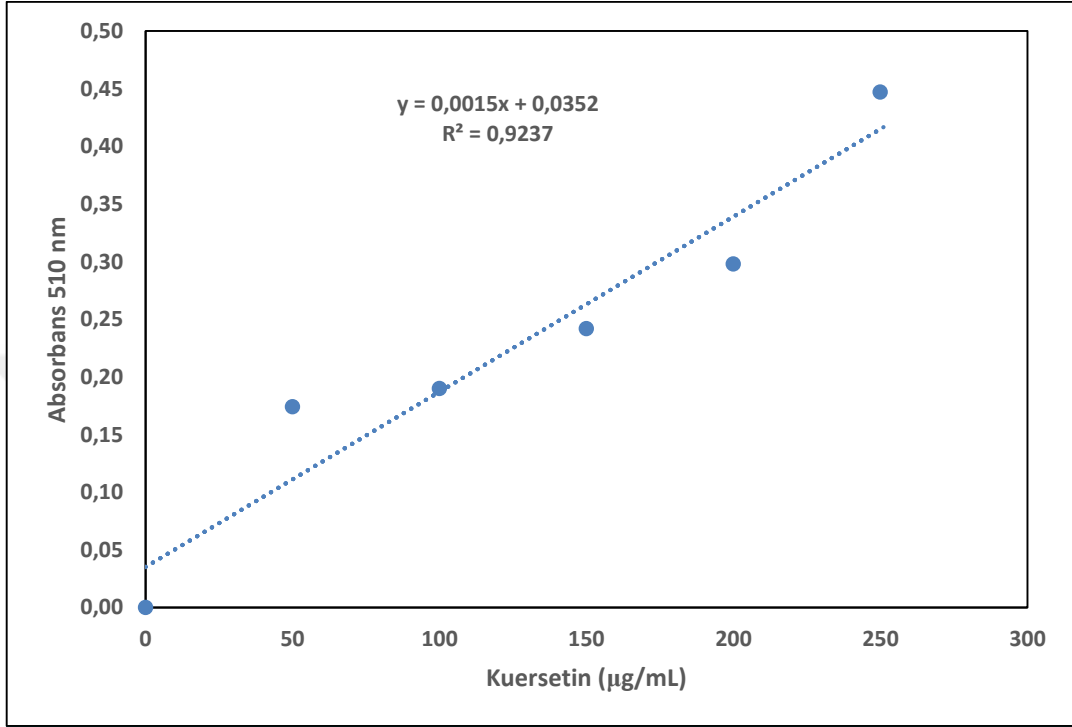
$$\text{Absorbans}_{(510\text{nm})} = 0,0008 [\text{Gallik asit}] - 0,0063$$



Şekil 20. Gallik asit standart grafiği

Şekil 21’de kuersetin standart grafiği denklemi $y = 0,0015x + 0,0352$ olarak bulundu. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

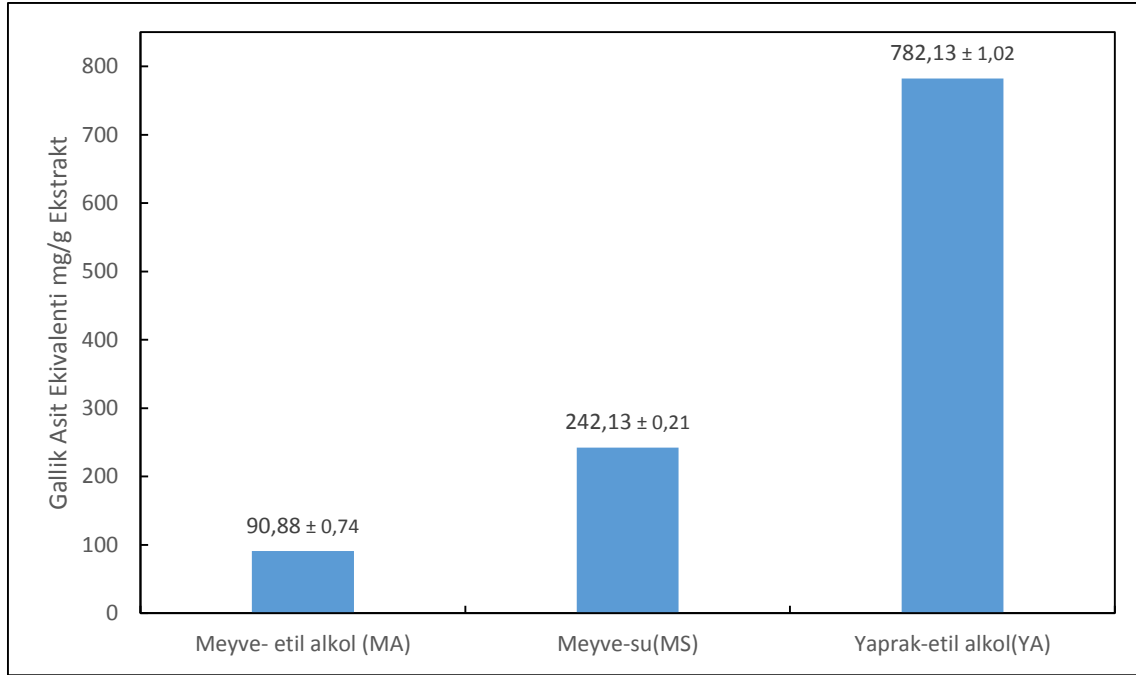
$$\text{Absorbans}_{(510 \text{ nm})} = 0,0015 [\text{Kuersetin}] + 0,0352$$



Şekil 21. Kueretin standart grafiği

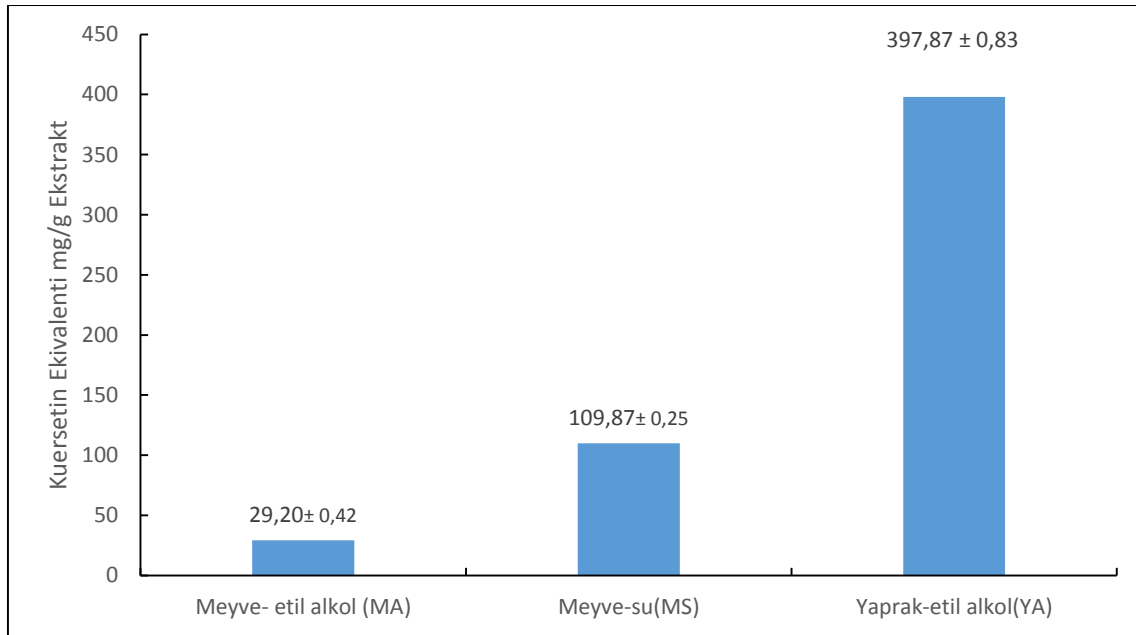
Kocayemiş meyvesinin etil alkol ve su ekstraktları ile kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktlarından elde edilen değerler gallik asit ve kuarsetin grafiklerindeki denklemler kullanılarak, gallik asit ve kuersetin eşdeğeri olan flavonoid bileşiklerine ait değerler hesaplandı. Sonuçlar Şekil 22 ve Şekil 23’te gösterildi.

Şekil 22’de görüldüğü üzere, kocayemiş meyvesinin etil alkol ve su ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içeriği sırasıyla $90,88 \pm 0,74$ ve $242,13 \pm 0,21$ mg/g olarak belirlendi. Kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içeriği $782,13 \pm 1,02$ mg/g olarak hesaplandı.



Şekil 22. Kocayemiş ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri

Şekil 23'te görüldüğü üzere, kocayemiş meyvesinin etil alkol ve su ekstraktlarının kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri sırasıyla $29,20 \pm 0,42$ ve $109,87 \pm 0,25$ mg/g olarak belirlendi. Kocayemiş yapraklarının etil alkol ekstraktının kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içeriği $397,87 \pm 0,83$ mg/g olarak belirlendi.



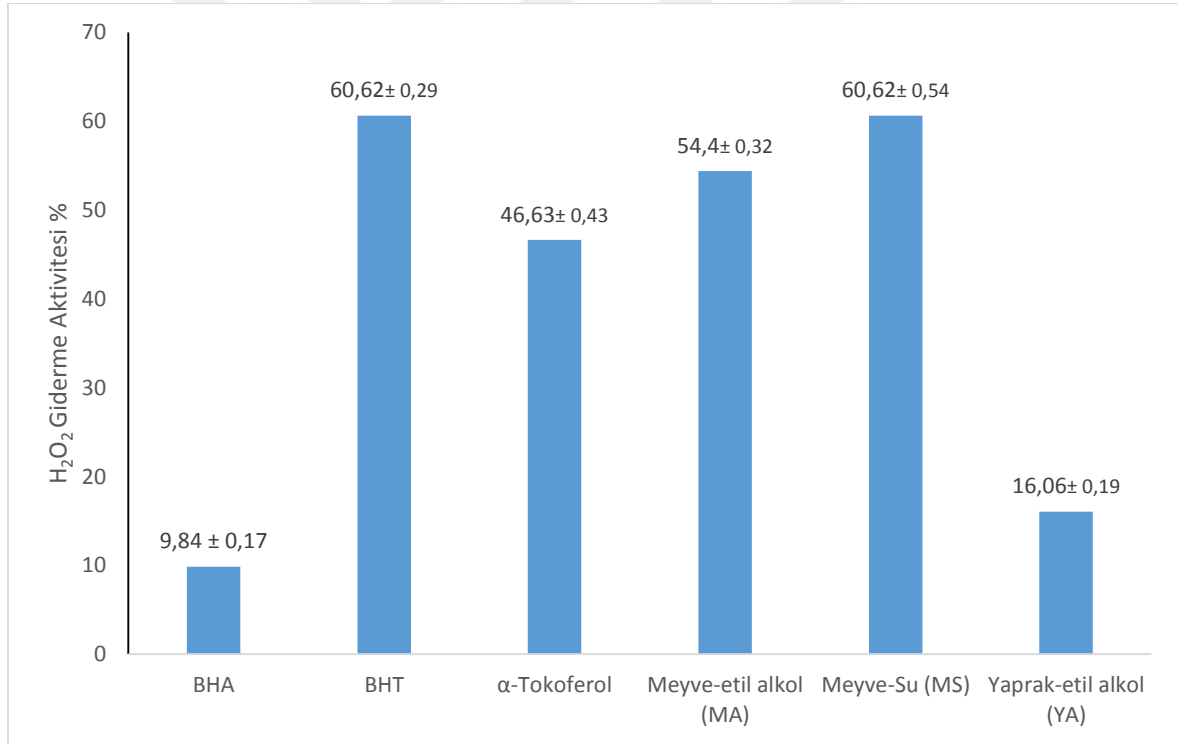
Şekil 23. Kocayemiş ekstraktlarının kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri

H₂O₂ GİDERME AKTİVİTESİ

Kocayemiş meyve etil alkol ve su ekstraktları ile kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktının, hidrojen peroksit giderme yeteneği Ruch ve ark. (39) metoduna göre çalışıldı.

Şekil 24'te görüldüğü üzere kocayemiş meyvesinin etil alkol, su ve yaprak etil alkol ekstraktının 100µg/mL konsantrasyonundaki H₂O₂ giderme aktivitesi sırasıyla; %54,4±0,32, %60,62±0,54, %16,06±0,19 olarak belirlendi.

Şekil 24'te görüldüğü üzere standart olarak kullanılan BHA, BHT, α-Tokoferol 100µg/mL konsantrasyonundaki H₂O₂ giderme aktivitesi sırasıyla; %9,84±0,17, %60,62±0,29, %46,63±0,43 olarak belirlendi.

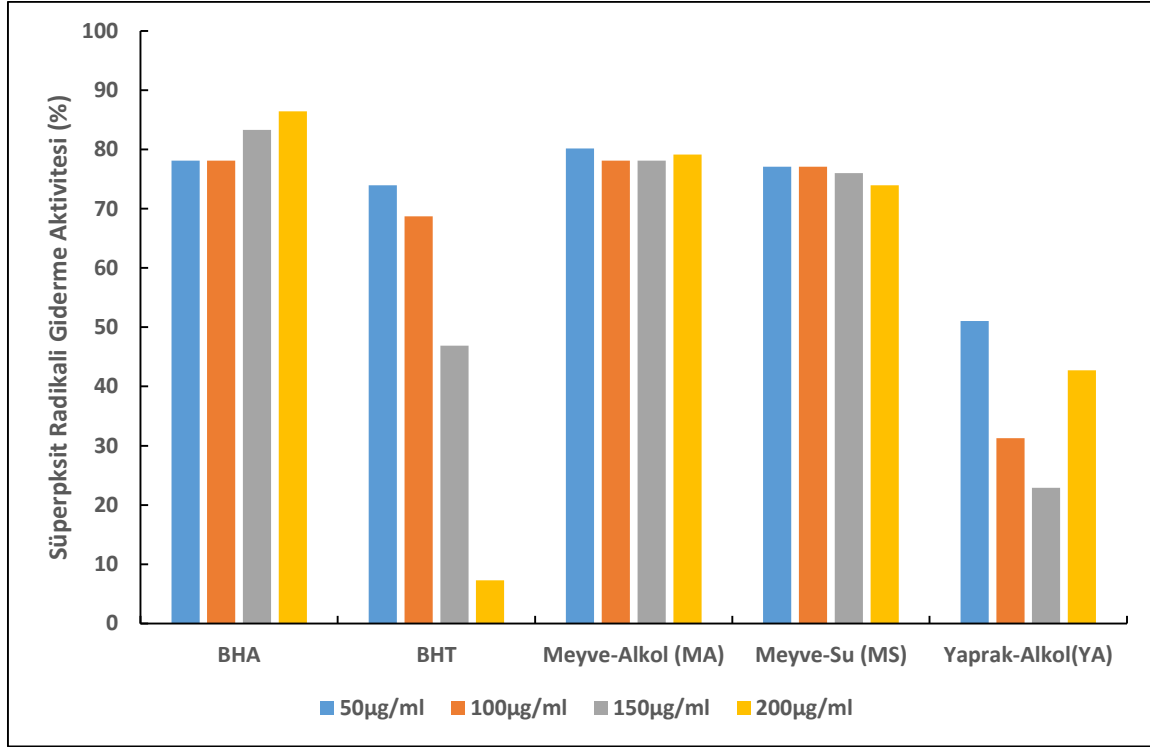


Şekil 24. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların H₂O₂ giderme aktiviteleri (%)

Şekil 24'teki grafikten yararlanarak, standartların ve kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının H₂O₂ giderme aktivitesi kıyaslanacak olursa BHT>MS>MA>αTokoferol>YA>BHA şeklinde olduğu görülmüştür.

SÜPEROKSİT RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının süperoksit radikalini giderme aktivitesini belirlemek için standart olarak BHA, BHT kullanılarak, süperoksit radikali giderme aktivitesi (%) grafiği oluşturuldu (Şekil 25).



Şekil 25. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri (%)

Şekil 25'ten anlaşılacağı üzere konsantrasyon artışı ile birlikte radikal giderme aktivitesinde sapmalar olduğu ve sonuç olarak süperoksit radikali giderme aktivitesinin değerinin konsantrasyona bağlı olmadığı sonucuna varıldı.

Tablo 5. Standartların farklı konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri (%)

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL
BHA	%78,12±0,91	%78,12±0,64	%83,33±0,74	%86,46±0,58
BHT	%73,96±0,62	%68,75±0,48	%46,88±0,27	%7,29±0,06

Kocayemiş meyvesinin su ekstraktının 50-100-150-200 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla %77,08±0,85, %77,08±0,19, %76,04±0,24, %73,96±0,57 olduğu belirlendi.

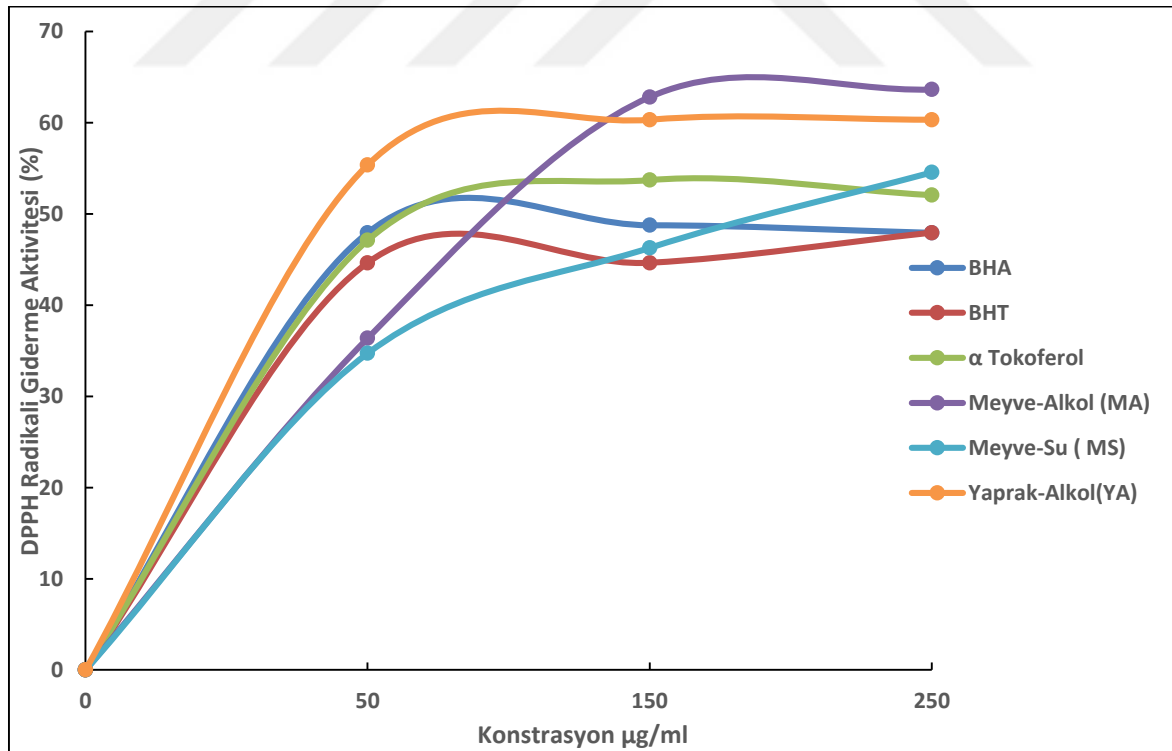
Kocayemiş meyvesinin etil alkol ekstraktının 50-100-150-200 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla %80,21±0,72, %78,13±0,36, %78,13±0,81, %79,17±0,96 olduğu tespit edildi.

Kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktının 50-100-150-200 µg/mL konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla %51,04±0,21, %31,25±0,42, %78,13±0,81, %22,92±0,31 olduğu belirlendi.

DPPH• RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprağının, serbest radikal giderme etkileri DPPH radikali kullanılarak tayin edildi. Standart madde olarak BHA, BHT ve α-tokoferol kullanıldı.

Şekil 26'da görüldüğü üzere, ekstraktların konsantrasyonunun artışı ile birlikte artan radikal giderme etkisi sergilediği saptandı.



Şekil 26. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların DPPH• radikali giderme aktiviteleri (%)

Tablo 6. DPPH• radikali giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerinin radikal giderme aktiviteleri (%)

Standartlar	50 µg/mL	150 µg/mL	250 µg/mL
α-tokoferol	%47,11±0,60	%53,72±0,42	%52,07±0,87
BHA	%47,93±0,69	%48,76±0,84	%47,93±0,93
BHT	%44,63±0,16	%44,63±0,43	%47,93±0,48

Kocayemiş meyvesinin su ekstraktının 50-150-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla %34,71±0,28, %46,28±0,69, %54,55±0,82 olduğu, kocayemiş meyvesinin etil alkol ekstraktının 50-150-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla %36,36±0,38, %62,81±0,53, %63,64±0,45 olduğu, kocayemiş yaprak etil alkol ekstraktının 50-150-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktivitelerinin ise sırasıyla %55,37±0,16, %60,33±0,48, %60,33±0,54 olduğu belirlendi.

Tablo 7 ve Tablo 8’de DPPH• radikalinin %50’sinin giderilmesi için gereken antioksidan konsantrasyonu olan EC₅₀ değeri kocayemiş ekstraktları ve standartlar için hesaplandı.

Tablo 7. Kocayemiş ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktivitesi verilerinden yararlanılarak hesaplanan EC₅₀ değerleri

EC ₅₀ (µg/mL)		
Ekstraktlar		
Kocayemiş meyve-su	Kocayemiş meyve-etil alkol	Kocayemiş yaprak-etil alkol
38,12±0,79	41,13±0,87	29,43±0,68

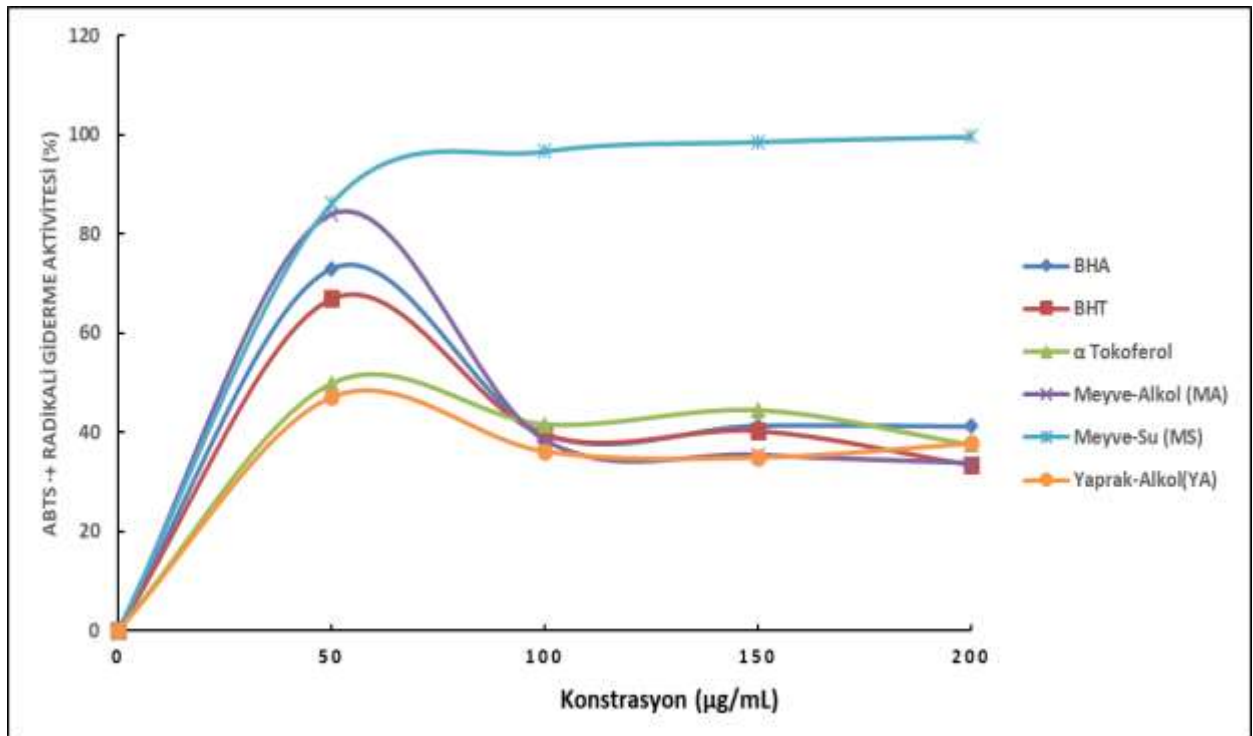
Tablo 8. Standartların DPPH• radikali giderme aktivitesi verilerinden yararlanılarak hesaplanan EC₅₀ değerleri

EC ₅₀ (µg/mL)		
Standartlar		
α-tokoferol	BHA	BHT
25,78±1,07	24,78±0,72	27,12±0,94

Tablo 7’de görüldüğü gibi, en düşük EC₅₀ değerinin kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktında olduğu, dolayısıyla en yüksek radikal giderme aktivitesine yaprak-etil alkol ekstraktında rastlandığı saptandı.

ABTS•⁺ RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların 50-200 µg/mL konsantrasyonlarında çalışıldı. Şekil 27’de görüldüğü üzere, ekstraktların ve standartların konsantrasyona karşı ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi grafiği çizildi.



Şekil 27. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri (%)

Şekil 27’de ve Tablo 9’da görüldüğü gibi ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi konsantrasyona bağlı olmadığı, düşük konsantrasyon değerinde (50 µg/mL) kocayemiş-su ekstraktı hariç diğer ekstraktların ve standartların daha fazla radikal temizleme özelliği gösterdiği, artan konsantrasyonlarda ise etkinliğinin değişmediği belirlendi.

Tablo 9. Standart çözeltilerin ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri (%)

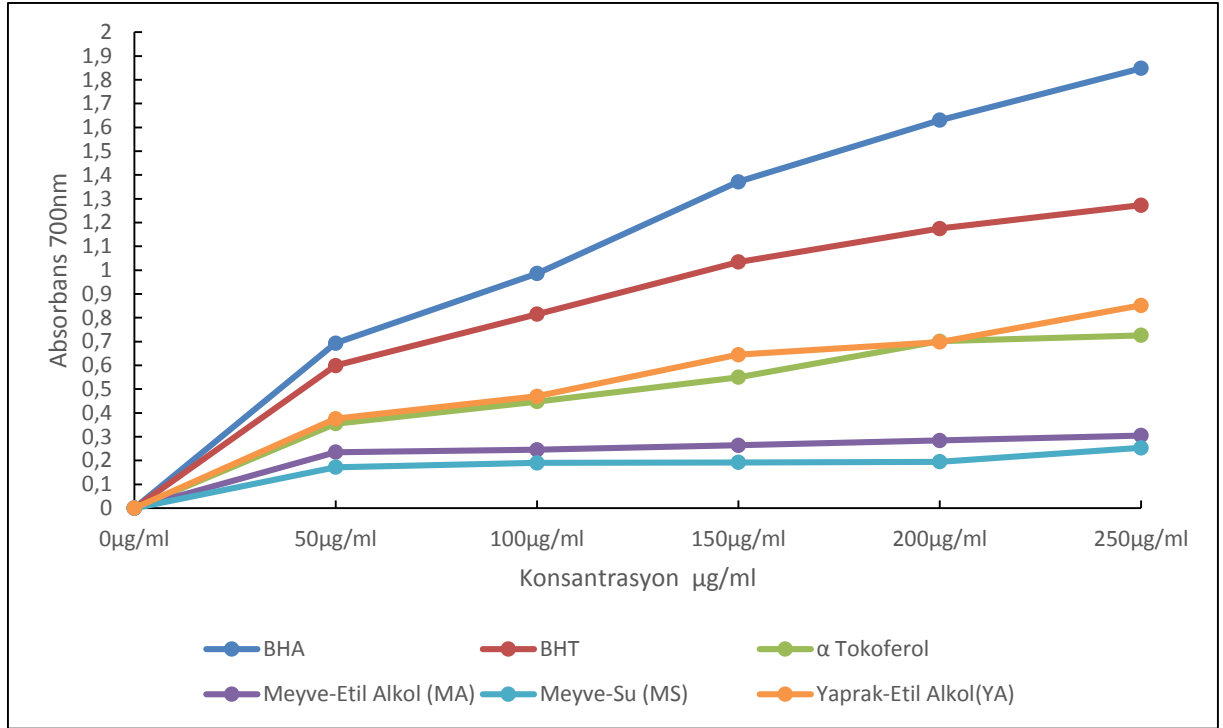
Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL
BHA	%73,04±0,65	%39,65±0,17	%41,34±0,63	%41,19±0,42
BHT	%66,96±0,32	%39,50±0,64	%40,31±0,37	%33,41±0,78
α-tokoferol	%49,85±0,09	%41,63±0,45	%44,49±0,28	%37,52±0,56

Kocayemiş meyvesinin su ekstraktının 50-100-150-200µg/mL konsantrasyonlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla %86,12±0,77, %96,69±0,82, %98,60±0,78, %99,63±0,65 olduğu, kocayemiş meyvesinin etil alkol ekstraktının 50-100-150-200µg/mL konsantrasyonlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitelerinin ise sırasıyla %83,90±0,91, %38,40±0,76, %35,40±0,48, %33,77±0,47 olduğu, kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktının 50-100-150-200µg/mL konsantrasyonlarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla %47,14±0,43, %36,20±0,83, %34,95±0,43, %37,81±0,32 olduğu belirlendi.

TOPLAM FERRİK İYONLARINI (Fe³⁺) İNDİRGEME KAPASİTESİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yapraklarının Fe³⁺ indirgeme kapasitesini tayin etmek üzere ekstraktların 50-100-150-250 µg/mL konsantrasyonları kullanıldı. Kocayemiş meyve ve yapraklarının Fe³⁺’ü indirgeme kapasitesini belirlemek için standart olarak BHA, BHT ve α-tokoferol ile çalışıldı.

Şekil 28’de görüldüğü üzere standart ve ekstraktların konsantrasyon-absorbans grafikleri oluşturuldu.



Şekil 28. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeme kapasiteleri

Şekil 28'de ve Tablo 10'de görüldüğü gibi indirgeme kapasitesi tayininde kocayemiş ekstraktlarının, standartlarla karşılaştırması yapıldığında, standartlardan daha yüksek aktiviteye sahip olmadığı gözlemlendi.

Tablo 10. Standart çözeltilerin Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
α-tokoferol	0,355±0,021	0,448±0,085	0,550±0,094	0,701±0,054	0,726±0,081
BHA	0,693±0,048	0,986±0,087	1,371±0,098	1,630±0,088	1,848±0,056
BHT	0,599±0,053	0,815±0,034	1,034±0,081	1,175±0,091	1,273±0,072

Kocayemiş meyvesinin su ekstraktının 50-100-150-200-250 µg/mL konsantrasyonlarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0,172±0,017, 0,190±0,009, 0,192±0,012, 0,195±0,003, 0,253±0,028 olduğu, kocayemiş meyvesinin etil alkol ekstraktının 50-100-150-200-250 µg/mL konsantrasyonlarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0,235±0,021, 0,245±0,017, 0,264±0,015, 0,284±0,018, 0,305±0,013 olduğu, kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktının 50-100-150-200-250 µg/mL konsantrasyonlarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme kapasiteleri ise sırasıyla 0,376±0,024, 0,470±0,016, 0,645±0,027, 0,698±0,019, 0,852±0,016 olduğu bulundu.

KAROTENÖİD İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kocayemiş meyvesindeki karotenoid içeriğinin belirlenmesi için Alasavar ve ark. (40) tarafından geliştirilen metod kullanıldı.

Kocayemiş meyvesinin kuru halinin 500 mg'ı ile yapılan çalışmada, karotenoid miktarının % 4,46 olduğu belirlenmiştir.

LİNOLEİK ASİT SİSTEMİNDE FERRİK TİYOSİYANAT (FTC) METODU İLE TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Deneyde ekstraktların doğal ve kimyasal antioksidanlarla karşılaştırmalı olarak lipid peroksidasyonunu azaltma yönündeki etkisi incelendi. Ekstraktlar ve standartlar için elde edilen değerler buna göre yorumlandı. Peroksidasyon işlemi 12 saatte bir ölçüm alınarak 84 saat süreyle izlendi ve kontrolün absorbans değerinin maksimum anındaki değerlerden hareketle ekstraktların ve standartların grafikleri çizildi (Şekil 29 ve Şekil 30).

Yapılan çalışmada Kocayemiş meyve su ekstraktının değerleri, anlamlı bulunmadığı için dahil edilmemiştir.

Şekil 29 ve Şekil 30'da kullanılan kısaltmalar:

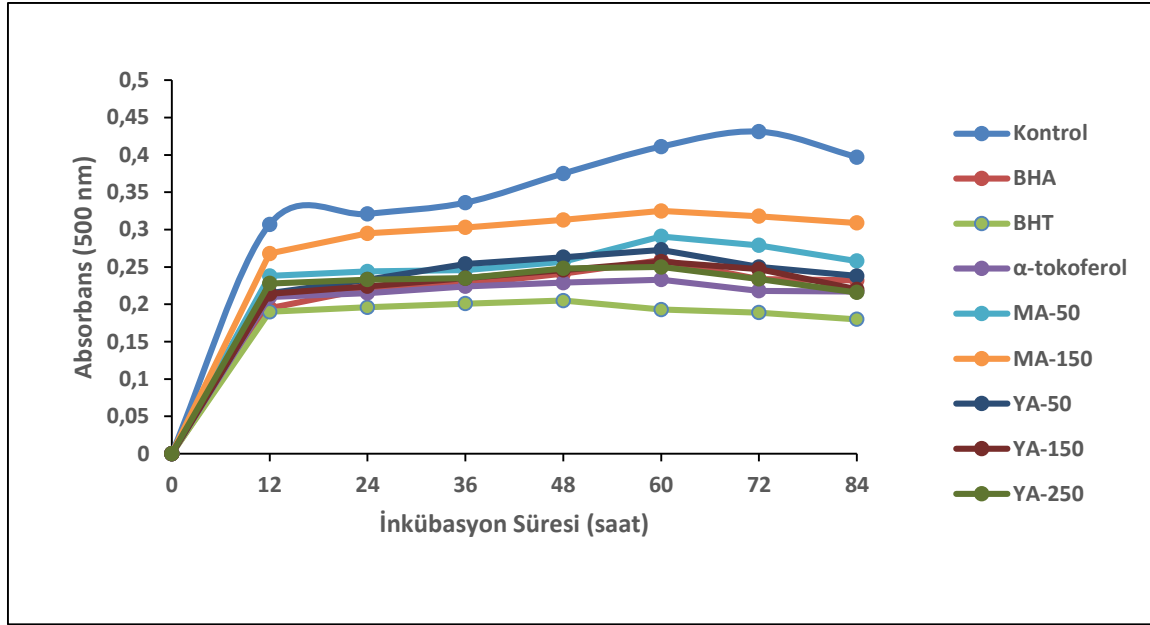
MA-50: 50 µg/mL Konsantrasyonda Meyve-etil alkol ekstraktı

MA-150: 150 µg/mL Konsantrasyonda Meyve-etil alkol ekstraktı

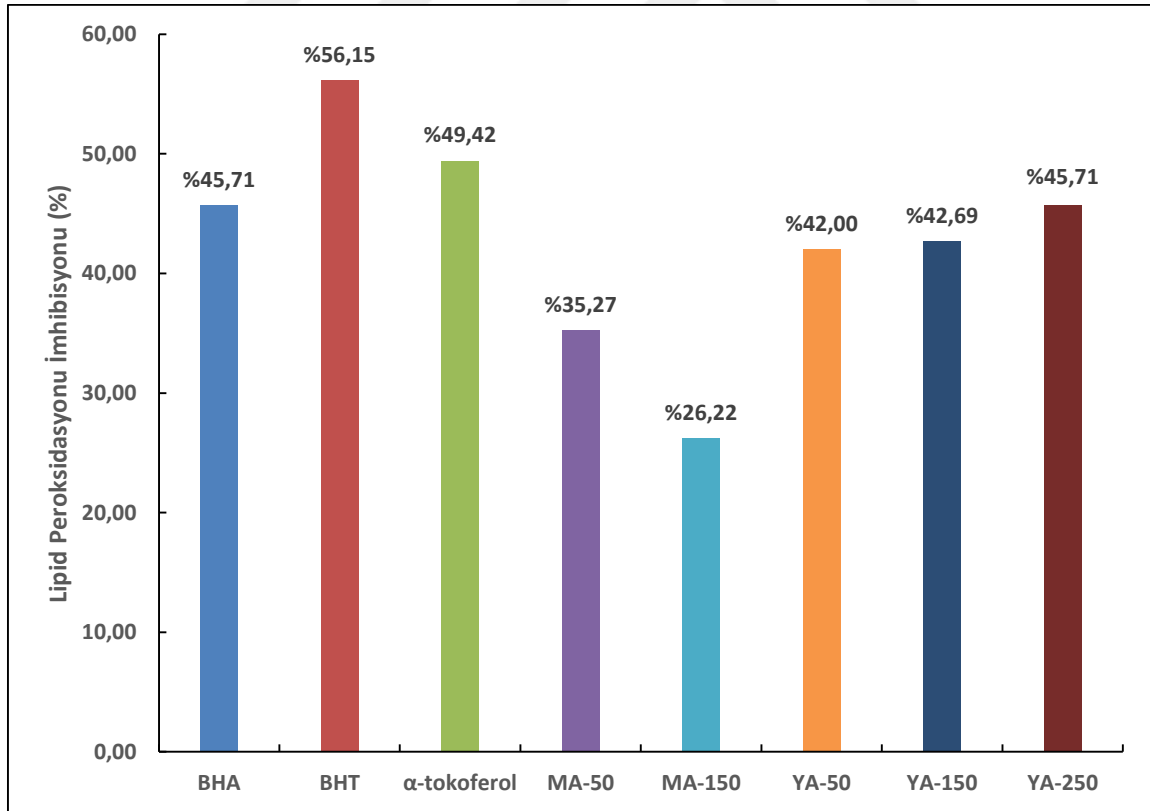
YA-50: 50 µg/mL Konsantrasyonda Yaprak-etil alkol ekstraktı

YA-150: 150 µg/mL Konsantrasyonda Meyve-etil alkol ekstraktı

YA-250: 250 µg/mL Konsantrasyonda Meyve-etil alkol ekstraktı



Şekil 29. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi



Şekil 30. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri

Şekil 30'da görüldüğü üzere, kocayemiş meyvesinin ve yapraklarının etil alkol ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla MA-50 için $35,27 \pm 0,13$, MA-150 için $26,22 \pm 0,24$, YA-50 için $42,00 \pm 0,67$, YA-150 için $42,69 \pm 0,22$, YA-250 için $45,71 \pm 0,34$, standart olarak kullanılan BHA, BHT ve α - tokoferolün 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda lipid peroksidasyonları ise sırasıyla $45,71 \pm 0,26$, $56,15 \pm 0,37$, $49,42 \pm 0,67$ olarak belirlendi.

LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE FENOLİK MADDE ANALİZİ

Kocayemiş meyve-etil alkol, meyve-su ve yaprak-etil alkol ekstraktının fenolik madde analizi TUTAGEM tarafından yapıldı. Toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde Kocayemiş meyve-etil alkol (KMA), Kocayemiş meyve-su (KMS) ve Kocayemiş yaprak- etil alkol (KMA) ekstraktları kullanılmıştır. Ekstraktların içerdiği fenolik madde miktarı ng/mL olarak belirlenmiştir. Deney sonuçlarında elde edilen değerler Tablo11, 12, 13, 14, 15, 16 ile Şekil 31, 32, 33, 34, 35, 36'da belirtilmiştir.

Tablo 11. Kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları

Bileşikler	Alıkonma süresi	Yanıt	Final konsantrasyon(ng/mL)
Gallik asit	1,711	199426	21209,2125
Protokateuik asit	1,880	18976	3393,2720
2,5-Dihidroksi benzoik asit	2,068	556	307,0106
Klorojenik asit	2,936	104	19,4332
Salisilik asit	3,010	693	51,8352
Siringik asit	3,075	130	239,5021
Kateşin	3,081	9698	6081,3847
Kafeik asit	3,050	666	43,2206
Gibberellik asit	3,248	0	
Rutin	3,187	1497	411,6836
Tirozol	3,187	104	684,3121
Narinjin	3,272	165	72,2839
Florizin	3,391	3398	250,9662
Oleropin	3,315	0	
2-Hidroksitrans sinamik asit	3,262	0	
p-kumarik asit	3,262	969	291,8486
Sinapik Acid	3,521	0	
Indol-3-asetik asit	3,523	0	
Absisik asit	3,588	6868	3620,1697
Etil gallat	3,320	178595	12973,0054
Trans Ferulik asit	3,278	39	12,9655
Verbascoside	3,550	0	
Mirisetin	3,434	1787	1762,9649
Jasmonik Acid	3,682	55	17,1843
Propil gallat	3,463	553	43,2856
Apigenin	3,689	0	
Kuersetin	3,553	12412	12533,5986
Resveratrol	3,850	0	
Ellajik asit	3,907	0	
Kemferol	3,655	81	131,5883
Lutolein	3,596	145	4,7281
İzorhamnetin	3,510	6860	11639,2030

Tablo 12. Kocayemiş meyve-su ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları

Bileşikler	Alıkonma süresi	Yanıt	Final Konsantrasyonu(ng/mL)
Gallik asit	1,744	75475	7969,7104
Protokatekuik Asit	1,914	39359	7064,4965
2,5-Dihidroksi benzoik asit	2,043	909	473,7714
Klorojenik asit	2,986	135	25,1920
Salisilik asit	3,027	430	32,1517
Siringik asit	3,041	129	237,8791
Kateşin	3,081	9454	5929,3533
Kafeik asit	3,042	533	34,6037
Gibberellik asit	3,088	0	
Rutin	3,204	2170	593,3890
Tirozol	3,195	75	499,0307
Narinjin	3,264	278	121,9230
Florizin	3,399	5366	389,7923
Oleropin	3,340	0	
2-Hidroksi trans sinamik asit	3,254	0	
p-kumarik asit	3,254	1711	514,5523
Sinapik asit	3,530	0	
İndol-3-asetik asit	3,574	0	
Absisik asit	3,580	11566	6089,0681
Etil gallat	3,328	124035	9011,4842
Trans Ferrulik asit	3,304	136	116,3894
Verbascoside	3,508	0	
Mirisetin	3,426	3418	3448,0881
Jasmonik Asit	3,665	105	29,9928
Propil gallat	3,463	599	46,6522
Apigenin	3,706	0	
Kuersetin	3,553	22291	22446,4056
Resveratrol	3,715	0	
Elajik asit	3,342	0	
Kemferol	3,689	132	202,8099
Lutolein	3,588	302	14,5276
İzorhamnetin	3,485	16689	28360,5744

Tablo 13. Kocayemiş hidroliz edilmiş meyve-etil alkol ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları

Bileşikler	Alıkonma süresi	Yanıt	Final Konsantrasyon(ng/mL)
Gallik asit	1,744	348176	37097,5668
Protokatekuik asit	1,922	39307	7055,1406
2,5-Dihidroksi benzoik asit	2,068	297	184,4583
Klorojenik asit	2,944	51	9,5275
Salisilik asit	3,018	501	37,4429
Siringik asit	3,033	109	211,4880
Kateşin	3,064	1080	715,0423
Kafeik asit	3,042	1159	75,2128
Gibberellik asit	3,273	0	
Rutin	3,187	489	140,0015
Tirozol	3,237	136	885,0233
Narinjin	3,281	124	54,0735
Florizin	3,408	1184	94,8329
Oleropin	3,087	0	
2-Hidroksi trans sinamik asit	3,254	0	
p-kumarik asit	3,254	2649	796,4891
Sinapik Asit	3,277	0	
İndol-3-asetik asit	3,549	0	
Absisik asit	3,597	3. 47	1769,5216
Etil gallat	3,328	250389	18185,8480
Trans Ferulik asit	3,295	65	40,7503
Verbascoside	3,744	0	
Mirisetin	3,434	19.95	19751,0015
Jasmonik Asit	3,691	135	37,6356
Propil gallat	3,463	542	42,4913
Apigenin	3,732	0	
Kuersetin	3,553	163095	163742,4436
Resveratrol	3,800	0	
Elajik Asit	3,949	0	
Kemferol	3,664	931	1335,8337
Lutolein	3,604	497	26,7366
İzorhamnetin	3,493	23007	39107,8799

Tablo 14. Kocayemiş hidroliz edilmiş meyve-su ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları

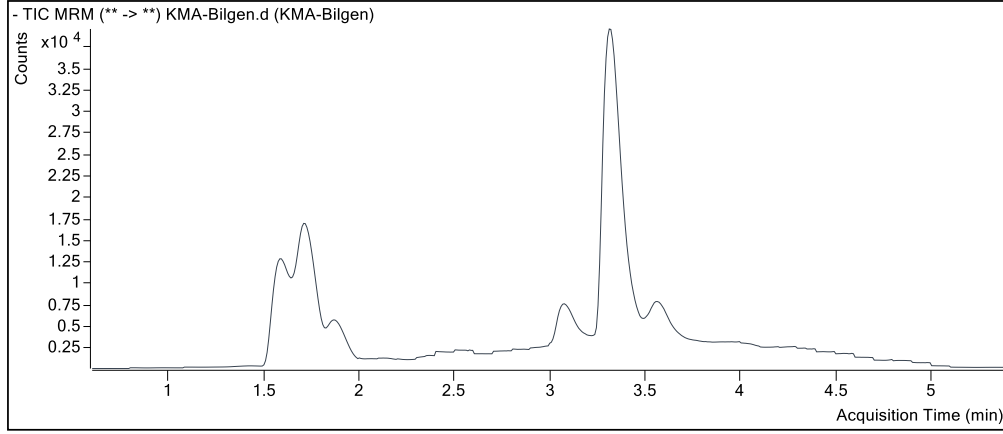
Bileşikler	Alıkonma süresi	Yanıt	Final Konsantrasyon(ng/mL)
Gallik asit	1,769	380154	40513,1942
Protokatekuik asit	1,972	161639	29088,9113
2,5-Dihidroksi benzoik asit	2,259	347	208,0409
Klorojenik asit	2,978	120	22,3126
Salisilik asit	3,018	481	35,9625
Siringik Asit	3,058	486	705,1499
Kateşin	3,013	408	296,3853
Kafeik asit	3,067	2445	158,6546
Gibberelik asit	3,130	0	
Rutin	3,196	503	143,7706
Tirozol	3,195	221	1416,7120
Narinjin	3,272	147	64,2980
Florizin	3,399	1055	85,7010
Oleropin	3,568	0	
2-Hidroksitrans sinamik asit	3,262	0	
p-kumarik asit	3,262	5885	1768,1675
Sinapik asit	3,395	0	
İndol-3-asetik asit	3,549	0	
Absisik asit	3,588	7419	3909,4232
Etil gallat	3,328	235608	17112,6024
Trans ferrulik asit	3,312	262	250,4709
Verbascoside	3,457	0	
Mirisetin	3,426	22240	22897,2038
Jasmonik Asit	3,682	358	94,6655
Propil gallat	3,479	892	68,0734
Apigenin	3,706	0	
Kuersetin	3,553	201094	201874,7786
Resveratrol	3,825	0	
Elajik asit	3,958	0	
Kemferol	3,672	965	1383,4100
Lutolein	3,613	1078	63,0324
İzorhamnetin	3,476	54742	93095,2694

Tablo 15. Kocayemiş hidrolize edilmiş yaprak-etil alkol ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları

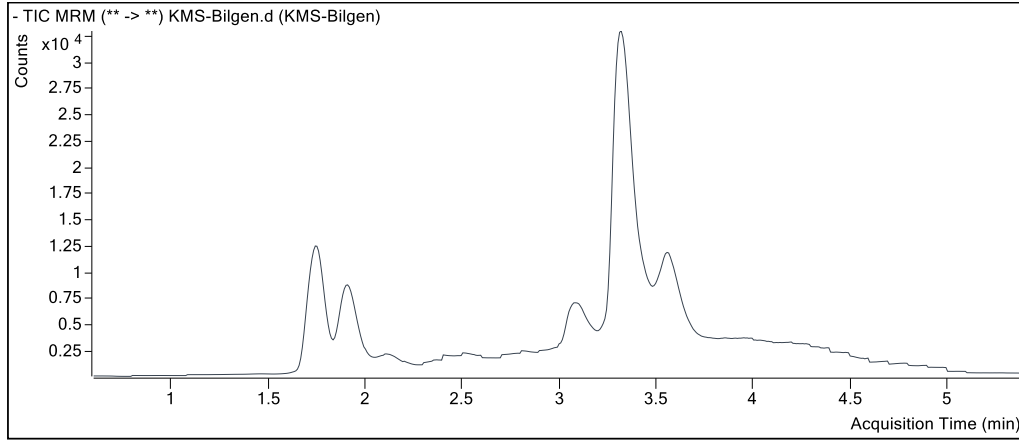
Bileşikler	Alıkonma süresi	Yanıt	Final Konsantrasyon(ng/mL)
Gallik asit	1,727	672616	71751,6793
Protokatekuik asit	1,914	10892	1937,1323
2,5-Dihidroksi benzoik asit	2,101	1374	693,5657
Klorojenik asit	2,953	13	2,4335
Salisilik asit	2,993	206	15,4173
Siringik asit	3,058	255	402,7734
Kateşin	3,081	10399	6517,8617
Kafeik asit	3,075	152	9,8475
Gibberellik asit	3,155	0	
Rutin	3,196	2161	590,7627
Tirozol	3,229	92	605,4781
Narinjin	3,289	87	37,9708
Florizin	3,357	2203	166,7062
Oleropin	3,281	0	
2-Hidroksitrans sinamik asit	3,262	0	
p-Kumarik asit	3,262	358	108,1628
Sinapik asit	3,268	0	
İndol-3-Asetik asit	3,768	0	
Absisik asit	3,631	25	23,9505
Etil gallat	3,337	114783	8339,6448
Trans Ferulik asit	3,287	513	518,4679
Verbascoside	3,483	44	43,5415
Mirisetin	3,434	223392	230747,8132
Jasmonik asit	3,758	35	12,2651
Propil gallat	3,361	86	9,1110
Apigenin	3,723	0	
Kuersetin	3,578	899879	903100,9235
Resveratrol	3,707	0	
Elajik asit	3,561	0	
Kemferol	3,681	29007	41114,3051
Lutolein	3,689	4464	274,6578
İzorhamnetin	3,468	4604	7802,3380

Tablo 16. Kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları

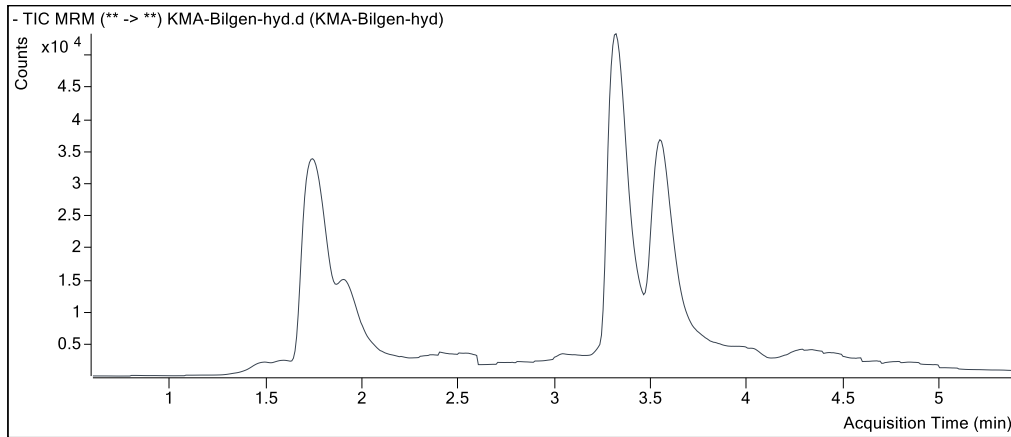
Bileşikler	Alıkonma süresi	Yanıt	Final Konsantrasyon(ng/mL)
Gallik asit	1,702	103783	10993,3885
Protokatekuik asit	1,855	2004	336,4461
2,5-Dihidroksibenzoik asit	2,085	2031	1003,9807
Klorojenik asit	2,894	32	6,0065
Salisilik asit	2,984	82	6,1366
Siringik asit	3,092	24	100,7932
Kateşin	3,081	15546	9722,3724
Kafeik asit	3,075	96	6,2102
Gibberellik asit	3,240	0	
Rutin	3,179	4239	1151,5253
Tirozol	3,195	40	277,2592
Narinjin	3,272	79	34,3943
Florizin	3,416	2041	155,2784
Oleropin	3,627	0	
2-Hidroksitrans sinamik asit	3,811	0	
p-kumarik asit	3,270	45	14,2554
Sinapik asit	3,648	0	
İndol-3-Asetik asit	3,726	0	
Absisik asit	3,580	64	44,1661
Etil gallat	3,396	36040	2622,2172
Trans ferrulik asit	3,278	38	10,9746
Verbascoside	3,508	297	97,2842
Mirisetin	3,459	776	718,5507
Jasmonik asit	3,682	114	32,2984
Propil gallat	3,446	148	13,6806
Apigenin	3,715	0	
Kuersetin	3,561	19143	19287,6884
Resveratrol	3,859	0	
Elajik asit	3,890	0	
Kemferol	3,672	371	542,4592
Lutolein	3,621	118	3,0193
İzorhamnetin	3,485	2655	4485,4148



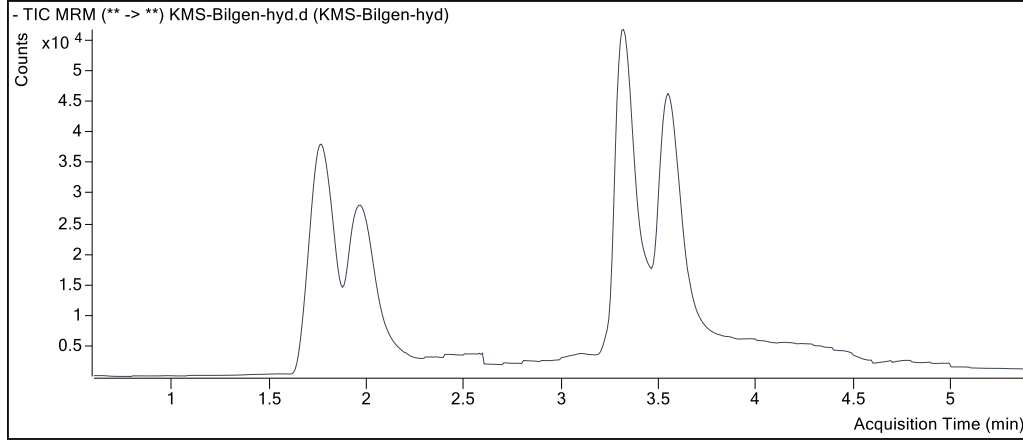
Şekil 31. Kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktının kütle spektrumu



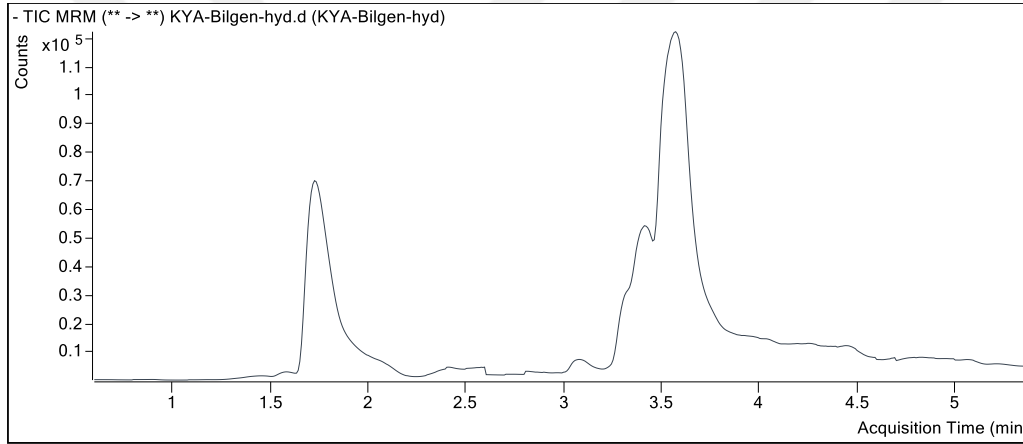
Şekil 32. Kocayemiş meyve-su ekstraktının kütle spektrumu



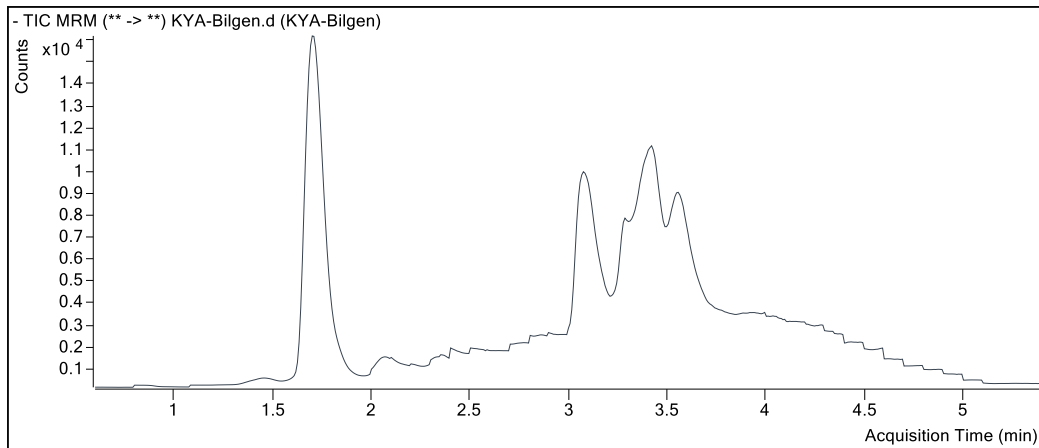
Şekil 33. Kocayemiş hidrolize edilmiş meyve-alkol ekstraktının kütle spektrumu



Şekil 34. Kocayemiş hidrolize edilmiş meyve-su ekstraktının kütle spektrumu



Şekil 35. Kocayemiş hidrolize edilmiş yaprak-etil alkol ekstraktının kütle spektrumu



Şekil 36. Kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının kütle spektrumu

TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında kocayemiş (*Arbutus Unedo* L.)'in meyve-su, meyve-etil alkol ve yaprak-etil alkol ekstraktlarının, toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarları tayin edilerek, ekstraktların antioksidan aktiviteleri çeşitli metodlar kullanılarak incelenmiştir.

Kocayemişin meyve-su ve meyve-etil alkol ekstraktlarının, ekstraksiyon verimleri sırasıyla 483,44 mg/g, 305,44 mg/g ekstrakt olarak bulundu. Kocayemişin yaprak-etil alkol ekstraktının, ekstraksiyon verimi ise 156,32 mg/g ekstrakt olarak bulundu.

Kocayemişin meyve ve yaprak ekstraktları arasında, en yüksek ekstraksiyon veriminin, kocayemişin meyve-su ekstraktında olduğu gözlemlendi.

TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK (TPC) TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının, toplam fenolik bileşik tayini çalışmasında (Şekil 15), kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktının 26,10±0,74 mg/g, meyve-su ekstraktının 49,10±1,97 mg/g ve yaprak-etil alkol ekstraktının ise 161,10±3,02 mg/g gallik asit eşdeğeri olarak fenolik madde bulundurduğu belirlendi. Bu bulgular dahilinde ekstraktların, fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri cinsinden YA>MS>MA olarak sıralanmıştır.

Toplam fenolik bileşik tayini çalışmasında (Şekil 16), kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktının 4,40±0,81 mg/g, meyve-su ekstraktının 18,60±0,47 mg/g ve yaprak-etil alkol ekstraktının 130,60±2,94 mg/g pirokateşol eşdeğeri olarak fenolik madde içerdiği belirlendi. Bu bulgular dahilinde ekstraktların fenolik madde içerikleri, pirokateşol eşdeğeri cinsinden YA>MS>MA olarak sıralanmıştır.

Yapılan iki çalışmada da toplam fenolik madde olarak pirokateşol ve gallik asit eşdeğeri olarak en yüksek değer kocayemişin yaprak-etil alkol ekstraktında olduğu gözlemlenmiştir.

Moualek I. ve ark. (52) tarafından yapılan çalışmada, kocayemiş meyvesinin gallik asit ekivalenti cinsinden toplam fenolik madde içerikleri $207,84 \pm 15,03$ mg/g olarak bildirilmiştir.

Koyu H. ve ark. (53) tarafından hazırlanan çalışmada, kocayemişin meyve-metanol ekstresinin gallik asit ekivalenti cinsinden toplam fenolik madde içerikleri $126,83 \pm 6,66$ mg/g olarak bildirilmiştir.

Orak H.H. ve ark. (54) tarafından yapılan çalışmada, kocayemişin yaprak-su ekstraktında gallik asit ekivalenti cinsinden toplam fenolik madde içeriklerini $197,16 \pm 1,43$ mg/g olarak bildirilmiştir.

Sakaldaş A. (55) tarafından yapılan çalışmada kocayemiş meyve ekstraktında gallik asit ekivalenti cinsinden toplam fenolik madde içeriklerinin $10,57$ mg/g ile $18,51$ mg/g arasında değerler aldığı, bildirilmiştir.

DEMİR (II) İYONLARINI ŞELATLAMA AKTİVİTESİ

Kocayemiş meyvesinin, demir (II) iyonlarını şelatma aktivitesi Şekil 19'da gösterilmiştir. Tablo 4'te görüldüğü üzere kocayemiş meyve ekstraktlarının $50-100-150-200$ $\mu\text{g/mL}$ tüm konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesinin, $\text{MS} > \text{MA}$ olduğu, sadece 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda $\text{MA} > \text{MS}$ olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3 ve Tablo 4'teki verilerden görüldüğü üzere, kocayemişin meyve ekstraktları ve standartların ($50-100-150-200$ $\mu\text{g/mL}$) tüm konsantrasyonlarında Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesinin sırasıyla $\text{EDTA} > \text{BHT} > \text{MS} > \text{MA} > \text{BHA}$, sadece 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesinin ise $\text{EDTA} > \text{BHT} > \text{MA} > \text{MS} > \text{BHA}$ şeklinde olduğu belirlendi.

Kocayemiş meyvelerinde Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesinin, konsantrasyona bağlı olmadığı ve çalışılan 5 farklı konsantrasyonda çoğunluk olarak meyve-su ekstraktının Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışılan meyve ekstraktlarının, Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesinin EDTA ve BHT çözeltisinden düşük, BHA'dan ise yüksek olduğu gözlenmiştir.

TOPLAM FLAVONOİD İÇERİĞİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yapraklarının flavonoid içeriği Şekil 20 ve Şekil 21'deki grafiklerden yararlanarak hesaplanmıştır.

Şekil 22'de görüldüğü üzere, kocayemiş meyve-etil alkol, meyve-su ve yaprak-etil alkol ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içeriğinin, sırasıyla $90,88 \pm 0,74$, $242,13 \pm 0,21$ ve $782,13 \pm 1,02$ mg/g olduğu belirlendi. Kocayemiş meyve ve yapraklarında flavonoid madde içeriklerinin, gallik asit eşdeğeri olarak YA> MS>MA şeklinde sıralandığı görülmektedir.

Şekil 23'te görüldüğü üzere, kocayemiş meyve-etil alkol, meyve-su ve yaprak-etil alkol ekstraktlarının kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içeriklerinin sırasıyla $29,20 \pm 0,42$, $109,87 \pm 0,25$ ve $397,87 \pm 0,83$ mg/g olduğu belirlendi. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarında, flavonoid madde içerikleri kuersetin eşdeğeri olarak YA> MS>MA şeklinde sıralandığı görülmektedir.

Moualek I. ve ark. (52) tarafından yapılan çalışmada, kocayemiş meyvesinin kuersetin ekivalenti cinsinden toplam flavonoid madde içeriklerinin $13,07 \pm 0,096$ mg/g olduğu bildirilmiştir.

Koyu H. ve ark. (53) tarafından hazırlanan derlemede, kocayemiş meyvesinin metanol ekstresinin kateşin ekivalenti cinsinden toplam flavonoid madde içeriklerinin $34,99 \pm 1,55$ mg/g olduğu bildirilmiştir.

Mangan B. (56) tarafından yapılan çalışmada, karadut meyvesinin gallik asit ekivalenti alındığında, flavonoid bileşen içeriği, yaprağın su ekstraktında $26,891$ µg/g, karadut meyvesinin su ekstraktında $31,279$ µg/g; yaprak metanol ekstraktında $42,317$ µg/g, karadut meyvesinin metanol ekstraktında $46,327$ µg/g; yaprağın aseton ekstraktında $39,617$ µg/g, karadut meyvesinin aseton ekstraktında ise $44,417$ µg/g olarak bildirilmiştir.

Kocayemişin meyve ve yaprak ekstraktındaki toplam flavonoid miktarı belirtilen çalışmalarla kıyaslandığında daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

H₂O₂ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların H₂O₂ giderme aktiviteleri Şekil 24'te gösterilmiştir.

Şekil 24'teki grafikten yararlanarak, 100 µg/mL'de kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının H₂O₂ giderme aktivitesi kıyaslanacak olursa MS>MA>YA şeklinde olduğu görülmüştür.

Şekil 24'teki grafikten yararlanarak, 100 µg/mL konsantrasyonda yapılan çalışmada kullanılan standartların H₂O₂ giderme aktivitesi kıyaslanacak olursa BHT>α-Tokoferol>BHA şeklinde olduğu görülmüştür.

Şekil 24'teki grafikten yararlanarak, 100 µg/mL konsantrasyonda yapılan çalışmada, kullanılan standartların ve kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının H₂O₂ giderme aktiviteleri, kıyaslanacak olursa BHT>MS>MA>α-Tokoferol>YA>BHA şeklinde olduğu görülmüştür.

Kocayemiş meyve-su ekstraktının H₂O₂ giderme aktivitesi standart olarak kullanılan BHT'den elde edilen sonuca oldukça yakın olduğu görülmüştür.

SÜPEROKSİT ANYON RADİKALİNİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi Şekil 25'te gösterilmiştir.

Şekil 25'ten anlaşılaçağı üzere konsantrasyon artışı ile birlikte süperoksit anyon radikali giderme aktivitesinde, sapmalar olduğu görüldüğünden, süperoksit radikali giderme aktivitesi değerinin, konsantrasyona bağı olmadığı sonucuna varılmıştır.

Kocayemiş ekstraktlarının 50-100-150-200 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla; meyve-su ekstraktında %77,08±0,85, %77,08±0,19, %76,04±0,24, %73,96±0,57, meyve-etil alkol ekstraktında %80,21±0,72, %78,13±0,36, %78,13±0,81, %79,17±0,96, yaprak-etil alkol ekstraktında ise %51,04±0,21, %31,25±0,42, %78,13±0,81, %22,92±0,31 olduğu belirlendi.

Tablo 5 ve Şekil 25'teki veriler değerlendirildiğinde; standartların ve kocayemiş ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitelerinin kıyaslandığında; 50 µg/mL konsantrasyonda: MA > BHA > MS > BHT > YA, 100 µg/mL konsantrasyonda: MA > BHA > MS > BHT > YA, 150 µg/mL konsantrasyonda: BHA > MA > MS > BHT > YA, 200 µg/mL konsantrasyonda: BHA > MA > MS > YA > BHT şeklinde olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmada genel olarak kocayemiş meyve etil alkol ekstraktının süperoksit radikali giderme aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür.

Orak H.H. ve ark. (54) tarafından yapılan çalışmada kocayemiş yaprak-su ekstraktının süperoksit radikali giderme aktivitesi 100 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda sırasıyla %56,87±1,58 ve %82,27±0,45 olarak bulunmuştur. Aynı konsantrasyonlarda BHA'nın süperoksit radikali giderme aktivitesi de sırasıyla %87,47±1,15 ve %99,03±0,12 olarak bulunmuştur.

Orak H.H. ve ark. (54) tarafından kocayemiş yaprak-su ekstraktı ile yapılan çalışma ile yaptığımız çalışmada aynı konsantrasyonda kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının süperoksit radikali giderme aktivitesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Küçükyıldırım T. (57) tarafından yapılan çalışmada, beyaz dut yaprağının su, aseton ve metanol ekstraktlarının 100 µg/mL konsantrasyonda süperoksit radikali giderme aktivitesi sırasıyla %51,97, %17,28, %23,57 olarak bulunmuştur. Beyaz dut meyvesinin su, aseton ve metanol ekstraktlarının 100 µg/mL konsantrasyonda süperoksit radikali giderme aktivitesi sırasıyla %71,96, %64,70, %35,65 olarak bulunmuştur. Standart olarak kullanılan α -tokoferol, BHA ve BHT'nin 100 µg/mL konsantrasyonda süperoksit radikali giderme aktivitesi sırasıyla %23,04, %77,47, %44,73 olarak bulunmuştur.

Küçükyıldırım T. (57) tarafından beyaz dut yaprağının aseton ve metanol ekstraktı ile yapılan çalışma ile yaptığımız çalışmada aynı konsantrasyondaki kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının, süperoksit radikali giderme aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışma için beyaz dut meyvesi ile aynı konsantrasyonda kocayemişin meyve-etil alkol ve meyve-su ekstraktının süperoksit radikali giderme aktivitesi karşılaştırıldığında, kocayemiş meyve-su ve meyve-etil alkol ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

DPPH• RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktivitesine ait grafik Şekil 26'da görülmektedir. Buna göre kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının artan konsantrasyonla birlikte radikal giderme aktivitesinde de bir artış görülmüştür.

Kocayemişin meyve ve yaprak ekstraktlarının 50-150-250 µg/mL konsantrasyonlarında DPPH• radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla; meyve-su ekstraktında %34,71±0,28, %46,28±0,69, %54,55±0,82, meyve-etil alkol ekstraktında %36,36±0,38, %62,81±0,53, %63,64±0,45 yaprak-etil alkol ekstraktında %55,37±0,16, %60,33±0,48, %60,33±0,54 olduğu belirlendi.

Tablo 6'da görüldüğü üzere, kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların DPPH• radikali giderme aktiviteleri kıyaslandığında; 50 µg/mL konsantrasyonda: YA>BHA> α -tokoferol>BHT>MA>MS, 150µg/mL konsantrasyonda: MA>YA> α -tokoferol>BHA>MS >BHT, 250µg/mL konsantrasyonda: MA>YA>MS> α -tokoferol>BHT>BHA şeklinde olduğu belirlendi.

Erboğa A. (58) tarafından yapılan çalışmada, kocayemiş meyvesinin etil alkol ekstraktında, DPPH tekniği ile 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla yüzde inhibisyon değeri $27,134 \pm 2,130$, $46,710 \pm 7,542$ $70,419 \pm 10,09$ olarak tespit edildiği belirtilmiştir.

Erboğa A. (58) tarafından yapılan çalışmadaki ortak olan 250 µg/mL konsantrasyonlarda DPPH• radikali giderme aktivitesi yaptığımız çalışmayla karşılaştırıldığında, yaptığımız çalışmanın daha yüksek değerde olduğu görülmüştür.

Orak H.H. ve ark. (54) tarafından yapılan çalışmada kocayemiş yapraklarının DPPH• radikali giderme aktivitesi 100 µg/mL konsantrasyonda; su ekstraktında $85,17 \pm 1,62$, etil alkol ekstraktında $79,47 \pm 1,31$, metil alkol ekstraktında $87,94 \pm 0,62$ olduğu bulunmuştur.

Orak H.H. ve ark. (59) tarafından yapılan çalışmada kocayemiş meyve ekstraktlarının 250 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonda DPPH• radikali giderme aktivitesi sırasıyla; taze meyve-etil alkol ekstraktında $47,87 \pm 0,23$, $94,03 \pm 1,18$, kuru meyve-etil alkol ekstraktında $20,22 \pm 1,19$, $70,04 \pm 0,68$ olduğu belirtilmiştir.

Tablo 7 ve Tablo 8'e göre kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standart çözeltilerin, DPPH• radikali giderme aktivitesi verilerinden yararlanılarak hesaplanan EC₅₀ değerleri kıyaslandığında; MA>MS>YA>BHT>α-tokoferol>BHA olduğu belirlendi. Kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının DPPH• radikali giderme aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Oliviera ve ark. (32) yılında yapılan çalışmada *Arbutus Unedo* L. yapraklarının etil alkol ekstraktının DPPH• radikali giderme aktivitesinin EC₅₀ değerlerini 63,2 µg/mL olarak belirlemişlerdir.

Koyu H. ve ark. (53) tarafından hazırlanan derlemede, kocayemiş meyvesinin olgunlaşmamış, orta olgunlukta ve olgun meyve ekstrelerinin EC₅₀ değerleri DPPH süpürücü aktivitesinin sırasıyla $0,58 \pm 0,03$, $0,37 \pm 0,02$ ve $0,25 \pm 0,02$ mg/mL olduğu bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının DPPH• radikali giderme aktivitesinin EC₅₀ değerinin, Oliviera ve ark. (32) yaptığı çalışmadan daha düşük değerde olması, yaptığımız çalışma verilerine göre kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının, DPPH• radikali giderme aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

ABTS•⁺ RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının ABTS•⁺ radikalini giderme aktiviteleri Şekil 27’de gösterilmiştir. Buna göre ekstraktların ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi konsantrasyona bağlı olmayıp, düşük konsantrasyon değerinde (50 µg/mL) su ekstraktı hariç diğer ekstraktların ve standartların daha fazla radikal temizleme özelliği gösterdiği, artan konsantrasyonlarda ise etkinliğinin değişmediği belirlendi.

Şekil 27 ve Tablo 9’da görüldüğü üzere kocayemişin meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların ABTS•⁺ giderme aktiviteleri kıyaslandığında; 50 µg/mL konsantrasyonda MS>MA>BHA>BHT>α-tokoferol>YA, 100 µg/mL konsantrasyonda MS>α-tokoferol>BHA>BHT>MA> >YA, 150 µg/mL konsantrasyonda MS>α-tokoferol> BHA>BHT>MA> >YA, 200µg/mL konsantrasyonda ise MS>BHA>YA>α-tokoferol> MA>BHT şeklinde olduğu belirlendi.

Tablo 9 ve Şekil 27 incelendiğinde ABTS•⁺ radikalinin giderme aktivitesinde, en yüksek değerin kocayemiş meyve-su ekstraktında olduğu görülmektedir.

Küçükyıldırım T. (57) tarafından yapılan çalışmada, beyaz dut meyvesinin ekstraktlarının, 50-100-150-200-250 µg/mL konsantrasyonlarda ABTS•⁺ radikallerinin giderilme aktivitesi sırasıyla; su ekstraktlarında, %76,247 %67,354, %46,529, %43,492, %40,672, aseton ekstraktlarında, %78,743, %72,670, %59,058, %58,010, %57,801, metanol ekstraktında, %59,024, %36,423, %15,285, %5,528, %4,228 olduğu belirtilmiştir.

Kocayemiş meyve-su ekstraktının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesinin, beyaz dut meyvesi ile yapılan çalışmadaki değerlerden yüksek olduğu görülmüştür.

Küçükyıldırım T. (57) tarafından yapılan çalışmada, beyaz dut yaprağının ekstraktlarının, 50-100-150-200-250 µg/mL konsantrasyonlarda ABTS•⁺ radikalinin giderilme aktivitesi sırasıyla, su ekstraktlarında, %64,107, %42,994, %23,800, %21,113, %21,689, aseton ekstraktlarında, %79,618, %73,795, %67,771, %63,755, %62,149, metanol ekstraktlarında, %72,314, %56,890, %36,662, %32,491, %30,341 olduğu belirtilmiştir.

Kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktı ile yaptığımız çalışmada ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesinin beyaz dut yaprağı ile yapılan çalışmaya göre, daha düşük, bazı konsantrasyonlarda ise yakın değerlerde olduğu görülmüştür.

TOPLAM FERRİK İYONLARINI (Fe^{+3}) İNDİRGEME KAPASİTESİNİN TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların Fe^{+3} indirgeme kapasiteleri Şekil 28’de gösterilmiştir. Şekil 28’de grafikte görüldüğü gibi kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların artan konsantrasyon ile birlikte artan bir indirgeme kapasitesinin olduğu görülmüştür. Ancak ekstraktların, standartlar kadar etkili indirgeme kapasitesi göstermediği belirlenmiştir.

Tablo 10 ve Şekil 28 incelendiğinde, kocayemişin meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların farklı konsantrasyonlarının Fe^{+3} ’ü giderme indirgeme kapasiteleri kıyaslandığında; 50 $\mu g/mL$ konsantrasyonda: BHA>BHT>YA> α -tokoferol>MA>MS, 100 $\mu g/mL$ konsantrasyonda: BHA>BHT>YA> α -tokoferol>MA>MS, 150 $\mu g/mL$ konsantrasyonda: BHA>BHT>YA> α -tokoferol>MA>MS, 200 $\mu g/mL$ konsantrasyonda: BHA>BHT> α -tokoferol>YA>MA>MS, 250 $\mu g/mL$ konsantrasyonda ise BHA>BHT>YA> α -tokoferol>MA>MS şeklinde olduğu belirlendi.

Tablo 10 ve Şekil 28 incelendiğinde kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının Fe^{+3} ’ü indirgeme kapasitelerinin YA>MA>MS şeklinde sıralandığı, standartların Fe^{+3} iyonlarını indirgeme kapasitesinin ise BHA>BHT> α -tokoferol şeklinde sıralandığı belirlendi.

KAROTENÖİD İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Karotenoidler, moleküler yapılarında bulunan konjüge çift bağ sayesinde antioksidan özellik gösterir ve serbest radikal oluşumunu önlerler (60).

Kocayemiş meyvesinin kuru halinin 500 mg’ı ile yapılan çalışmada, Karotenoid miktarının %4,46 olduğu belirlenmiştir.

Alasavar ve ark. (48) tarafından yapılan çalışmada, mor havucun karotenoid içeriğini $19,5 \pm 0,5 mg/100g$ olarak belirlemişlerdir.

LİNOLEİK ASİT SİSTEMİNDE FERRİK TİYOSİYANAT (FTC) METODU İLE TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Kocayemiş meyve ve yaprağının etil alkol ekstraktlarında Ferrik tiyosiyanat (FTC) metoduna göre belirlenen lipid peroksidasyonu Şekil 29’da gösterilmiştir. Şekil 30’da görüldüğü gibi 50 $\mu g/mL$ konsantrasyonda kocayemiş ekstraktlarının ve standartların, lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri karşılaştırıldığında; BHT> α -tokoferol>BHA>YA>MA şeklinde bir sıralama olduğu görülmüştür.

Standart çözeltilerde, lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri sırasıyla BHT> α -tokoferol> BHA şeklindedir (Şekil 30).

Kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktının lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdesinin konsantrasyona bağlı olmadığı görülmüştür (Şekil 30).

Kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdesi sırası ile YA-250>YA-150>YA-50 şeklinde olduğu ve konsantrasyon arttıkça arttığı görülmüştür (Şekil 30).

Gülçin İ. (61) tarafından yapılan çalışmada, 10 ve 30 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda, kafeik asit, sırasıyla linoleik asit emülsiyonunun lipid peroksidasyonunda %68,2 ve %75,8 inhibisyon gösterdiği, öte yandan, BHA, BHT, α -tokoferol ve trolox gibi 20 $\mu\text{g/mL}$ standart antioksidan, linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunda sırasıyla %74,4, 71,2, 54,7 ve 20,1'lik bir inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir.

LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE FENOLİK MADDE ANALİZİ

Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktının LC-MS/MS yöntemine göre fenolik madde analizinde, Bayram N. ve ark. (51) tarafından geliştirilen metod kullanılmıştır

Şekil 31-35'te elde edilen fenolik maddelerin spektrumları gösterilmiştir.

Tablo 11-16'da görüldüğü gibi 32 farklı fenolik madde ile analizi yapılan kocayemişin tüm meyve ekstraktlarının bileşiminde bulunan fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, 2,5-Dihidroksi benzoik asit, klorojenik asit, salisilik asit, siringik asit, kateşin, kafeik asit, rutin, tirozol, narinjin, florizin, p-kumarik asit, absisik asit, etil gallat, trans ferulik asit, mirisetin, jasmonik asit, propil gallat, kuersetin, kemferol, lutolein, izorhamnetin olarak belirlenmiştir. Meyve ekstraktlarında, oleropin, 2-hidroksitranssinamik asit, sinapik asit, Indol-3-asetik asit, verbascoside, apigenin, resveratrol, elajik asit ve gibberalik asit gözlenmemiştir.

Tablo 11'de görüldüğü gibi analizi yapılan kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktının bileşiminde bulunan içinde en fazla konsantrasyonda gallik asit (21209,2125 ng/mL) en düşük konsantrasyonda ise lutolein (4,7281ng/mL) bulunmuştur. Fenolik maddelerin konsantrasyona göre sıralaması yapıldığında gallik asit>etil gallat>kuersetin>izorhamnetin>kateşin>absisik asit>protokatekuik asit>mirisetin>rutin>2,5-dihidroksi benzoik asit>p-kumarik asit>siringik asit>kemferol şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 12’te görüldüğü gibi analizi yapılan kocayemiş meyve-su ekstraktının bileşiminde bulunan fenolik maddeler içinde en fazla konsantrasyonda izarhamnetin (28368,5744 ng/gr) en düşük konsantrasyonda ise klorojenik asit (25,1920 ng/gr) bulunmuştur. Fenolik maddelerin konsantrasyona göre sıralaması yapıldığında izarhamnetin>kuersetin>etil gallat>kuersetin>gallik asit>kateşin>protokatekuik asit>absisik asit>kateşin>mirisetin>rutin> p-kumarik asit>tirozol>2,5-dihidroksi benzoik asit şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 13’te görüldüğü gibi analizi yapılan kocayemişin hidrolize edilmiş meyve-etil alkol ekstraktının bileşiminde bulunan fenolik maddeler içinde en fazla konsantrasyonda kuersetin (163742,4436 ng/mL) en düşük konsantrasyonda ise klorojenik asit (9,5275 ng/mL) bulunmuştur. Fenolik maddelerin konsantrasyona göre sıralaması yapıldığında kuersetin>izarhamnetin>gallik asit>mirisetin>etil gallat>protokatekuik asit>absisik asit>kemferol>tirozol>p-kumarik asit>kateşin>siringik asit şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 14’te görüldüğü gibi analizi yapılan kocayemişin hidrolize edilmiş meyve-su ekstraktının bileşiminde bulunan fenolik maddeler içinde en fazla konsantrasyonda kuersetin (201874,7786 ng/gr) en düşük konsantrasyonda ise klorojenik asit (22,3126 ng/gr) bulunmuştur. Fenolik maddelerin konsantrasyona göre sıralaması yapıldığında kuersetin>izarhamnetin>gallik asit>protokatekuik asit>mirisetin>etil gallat>absisik asit>p-kumarik asit>kemferol>tirozol>siringik asit şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 15 ve 16’da görüldüğü gibi analizi yapılan kocayemişin tüm yaprak-etil alkol ekstraktlarının bileşiminde bulunan fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, 2,5-Dihidroksi benzoik asit, klorojenik asit, salisilik asit, siringik asit, kateşin, kafeik asit, rutin, tirozol, narinjin, florizin, p-kumarik asit, absisik asit, etil gallat, trans ferulik asit, mirisetin, jasmonik asit, propil gallat, kuersetin, kemferol, lutolein, izarhamnetin, verbescoside olarak belirlenmiştir.

Yaprak ile yapılan çalışmalarda; oleropin, 2-hidroksitranssinamik asit, sinapik asit, Indol-3-asetik asit, apigenin, resveratrol, elajik asit ve gibberalik asit gözlenmemiştir.

Tablo 15’te görüldüğü gibi analizi yapılan kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının bileşiminde bulunan fenolik maddeler içinde en fazla konsantrasyonda kuersetin (19287,6884 ng/mL) en düşük konsantrasyonda ise lutolein (3,0193 ng/mL) bulunmuştur. Fenolik maddelerin konsantrasyona göre sıralaması yapıldığında kuersetin>gallik asit>kateşin>izarhamnetin>etil gallat>rutin>2,5-dihidroksi benzoik asit>mirisetin>kemferol>protokatekuik asit>tirozol şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 16’da görüldüğü gibi analizi yapılan kocayemiş hidrolize edilmiş yaprak-etil alkol ekstraktının bileşiminde bulunan fenolik maddeler içinde en fazla konsantrasyonda kuersetin (903100,923 ng/mL) en düşük konsantrasyonda ise klorojenik asit (2,4935 ng/mL) bulunmuştur. Fenolik maddelerin konsantrasyona göre sıralaması yapıldığında kuersetin>mirisetin>gallik asit>kemferol>etil gallat>izorhamnetin>kateşin>prorokatekuik asit>klorojenik asit>tirozol>rutin>trans ferulik asit>siringik asit şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Ayaz F.A. ve ark. (62) yaptığı çalışmada, GC-MS kullanılarak, çilek ağacı (*Arbutus unedo* L.) meyvelerinde fenolik ve uçucu olmayan asitler ve çözünür şekerler tanımlandı ve miktarları belirlendi. Ölçülen fenolik asitler gallik (10,7 mg/g kuru ağırlık), gentisik (1,9 mg/g), protokatekuik (0,6 mg/g), p- hidroksibenzoik (0,3 mg/g), vanilik (0,12 mg/g) ve manisik (0,05 mg/g). Uçucu olmayan asitler grubundan fumarik (1,94 mg/g kuru ağırlık), laktik (0,84 mg/g), malik (0,84 mg/g), suberik (0,23 mg/g) ve sitrik asit bulunmuştur (62).

Erkekler Z. ve ark. (63) tarafından yapılan çalışmada, ince tabaka kromatografisi ile tüm yaprak örneklerinde kuersetin, izokersitrin, hiperosid, rutin ve klorojenik asit ile meyvelerde sadece izokersitrin içerdiği belirtilmiştir (63).

SONUÇLAR

Antioksidanlar, organizmada farklı sebeplerle oluşan serbest radikallerin olumsuz etkilerini yok etmek için önemli bir yere sahiptirler. Bu noktada diyet ile alınabilecek doğal antioksidanların ve aktivitelerinin incelenmesi faydalı olmaktadır.

Bu tez çalışmasında, *Arbutus unedo* L. meyvesinin meyve ve yapraklarının farklı yöntemler ve farklı konsantrasyonlarda bioaktif bileşenlerinin bulunmasıyla beraber antioksidan aktivitelerinin incelenip, literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır. Çalışılan metotlar ve sonuçları:

Toplam fenolik bileşik tayini metodunda, standart olarak gallik asit ve pirokateşol kullanıldı. Grafikler yardımıyla, kocayemiş meyve ve yaprağının, gallik asit ve pirokateşol eşdeğeri olarak, fenolik madde içerikleri tespit edildi. Metotta, gallik asit eşdeğeri olarak en yüksek fenolik madde miktarının kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktında ($161,10 \pm 3,02$ mg GAE/g) bulunduğu, pirokateşol cinsinden de en yüksek fenolik madde miktarının yine kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktında ($130,60 \pm 2,94$ mg PKE) bulunduğu belirlendi.

Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi metodunda, standart olarak; BHA, BHT ve EDTA kullanıldı. $250 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standartlar arasında en yüksek şelatlama aktivitesini EDTA ($98,66 \pm 0,21$), aynı konsantrasyonda kocayemiş ekstraktları içinde ise en yüksek şelatlama aktivitesini meyvenin etil alkol ekstraktı ($14,27 \pm 0,04$) göstermiştir.

Toplam flavonoid içeriği tayini metodunda, standart olarak gallik ve kuersetin kullanıldı. Grafikler yardımıyla, kocayemiş meyve ve yaprağının gallik asit ve kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri tespit edildi. Metotta, gallik asit eşdeğeri olarak en yüksek miktarda flavonoid madde miktarının kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktında ($782,13 \pm 1,02$ mg GAE/g) bulunduğu, kuersetin eşdeğeri olarak en yüksek flavonoid miktarının da yine kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktında ($397,87 \pm 0,83$ mg QUE/g) bulunduğu belirlendi.

H₂O₂ giderme aktivitesi tayini metodunda, standart olarak BHA, BHT ve α -tokoferol kullanıldı. 100 μ g/mL konsantrasyonda standartlar içinde en yüksek H₂O₂ giderme aktivitesini BHT ($60,62 \pm 0,29$), aynı konsantrasyonda kocayemiş ekstraktları içinde en yüksek H₂O₂ giderme aktivitesini ise kocayemiş meyve-su ($54,4 \pm 0,32$) ekstraktı göstermiştir.

Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesinin tayini metodunda, standart olarak; BHA ve BHT kullanıldı. Standartlar içinde en yüksek süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi 200 μ g/mL konsantrasyonda BHA ($86,46 \pm 0,58$), aynı konsantrasyonda kocayemiş ekstraktları içinde en yüksek süperoksit anyon radikali giderme aktivitesini ise kocayemiş meyve-etil alkol ($79,17 \pm 0,96$) ekstraktı göstermiştir.

DPPH• radikali giderme aktivitesinin tayini metodunda standart olarak; BHA, BHT ve α -tokoferol kullanıldı. 250 μ g/mL konsantrasyonda standartlar arasında en yüksek DPPH• radikal giderme aktivitesini α -tokoferol ($52,07 \pm 0,87$), aynı konsantrasyonda kocayemiş ekstraktları içinde en yüksek DPPH• radikal giderme aktivitesini ise kocayemiş meyve-etil alkol ($63,64 \pm 0,45$) ekstraktı göstermiştir. EC₅₀ değerleri için; DPPH• radikali giderme aktivitesi en yüksek olan standartın α -tokoferol ($25,78 \pm 1,07 \mu$ g/mL), kocayemiş ekstraktları içinde en yüksek DPPH• radikal giderme aktivitesini ise kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktının ($29,43 \pm 0,68 \mu$ g/mL) sahip olduğu bulunmuştur.

ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesinin tayini metodunda standart olarak; BHA, BHT ve α -tokoferol kullanıldı. 200 μ g/mL konsantrasyonda standartlar arasında en yüksek ABTS•⁺ radikal giderme aktivitesini BHA ($41,19 \pm 0,42$), aynı konsantrasyonda kocayemiş ekstraktları içinde en yüksek ABTS•⁺ radikal giderme aktivitesini ise kocayemiş meyve-su ($99,63 \pm 0,65$) ekstraktı göstermiştir.

Toplam ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kapasitesi tayini metodunda standart olarak; BHA, BHT ve α -tokoferol kullanıldı. 250 μ g/mL konsantrasyonda standartlar içinde en yüksek Fe³⁺ giderme aktivitesini BHA ($1,848 \pm 0,056$), aynı konsantrasyonda kocayemiş ekstraktları içinde en yüksek Fe³⁺ giderme aktivitesini ise kocayemiş yaprak-etil alkol ($0,852 \pm 0,016$) ekstraktı göstermiştir.

Karotenoid içeriklerinin belirlenmesinde, 500 mg kocayemiş meyve örneğinde yapılan çalışmada Karotenoid miktarının % 4,46 olduğu bulunmuştur.

Linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu kullanılarak lipid peroksidasyonunu inhibe etmeleri, BHA, BHT, α - tokoferol ile sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirildi. 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standartlar içinde en yüksek lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdesi BHT (%56,15 $\pm$ 0,37), aynı konsantrasyonda kocayemiş ekstraktları içinde en yüksek lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdesi ise kocayemiş yaprak-etil alkol (%45,71 $\pm$ 0,34) ekstraktı göstermiştir.

LC-MS/MS yöntemine göre fenolik madde analizinde, yapılan kocayemişin tüm meyve ekstraktlarının bileşiminde bulunan fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, 2,5-Dihidroksi benzoik asit, klorojenik asit, salisilik asit, sirینگik asit, kateşin, kafeik asit, rutin, tirozol, narinjin, florizin, p-kumarik asit, absisik asit, etil gallat, trans ferulik asit, mirisetin, jasmonik asit, propil gallat, kuersetin, kemferol, lutolein, izorhamnetin olarak belirlenmiştir.

Meyve ekstraktlarında, oleropin, 2-hidroksitranssinamik asit, sinapik asit, Indol-3-asetik asit, verbascoside, apigenin, resveratrol, elajik asit ve gibberalik asit gözlenmemiştir. LC-MS/MS yöntemine göre fenolik madde analizinde, kocayemişin tüm yaprak-etil alkol ekstraktlarının bileşiminde bulunan fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, 2,5-Dihidroksi benzoik asit, klorojenik asit, salisilik asit, sirینگik asit, kateşin, kafeik asit, rutin, tirozol, narinjin, florizin, p-kumarik asit, absisik asit, etil gallat, trans ferulik asit, mirisetin, jasmonik asit, propil gallat, kuersetin, kemferol, lutolein, izorhamnetin, verbescoside olarak belirlenmiştir.

Yaprak ile yapılan çalışmalarda; oleropin, 2-hidroksitranssinamik asit, sinapik asit, Indol-3-asetik asit, apigenin, resveratrol, elajik asit ve gibberalik asit gözlenmemiştir.

ÖZET

Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) meyvesinin ve yaprağının, su ve etil alkol ekstraktlarının içerdiği fenolik madde miktarı, fenolik madde çeşitleri, antioksidan aktiviteleri; farklı konsantrasyon ve farklı metodlarla incelendi.

Kocayemişin en yüksek ekstrakt verimi, meyve-su ekstraktında (483,44 mg/g) gözlenmiştir. Toplam fenolik bileşik ve toplam flavonoid madde içeriği olarak, en yüksek madde içeriğinin kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktında olduğu belirlenmiştir.

Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi, kocayemişin diğer ekstraktları ile karşılaştırıldığında, en fazla şelatlama aktivitesinin, kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktında olduğu gözlenmiştir. H₂O₂ giderme aktivitesi bakımından, kocayemişin ekstraktları arasında en yüksek H₂O₂ giderme aktivitesini, kocayemişin meyve-su ekstraktı göstermiştir.

Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayininde, ekstraktlar arasında kocayemiş meyve-etil alkol ekstraktının, daha yüksek süperoksit radikali giderme aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. DPPH• radikali giderme aktivitesi açısından incelendiğinde, ekstraktlar arasında en yüksek aktivite değeri, kocayemiş meyve- etil alkol ekstraktında gözlenmiştir.

ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesinin tayininde, kocayemiş ekstraktları arasında, kocayemiş meyve-su ekstraktının daha yüksek aktivite göstermiştir. Toplam ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kapasitesi incelendiğinde, ekstraktlar arasında en yüksek demir indirgeme kapasitesi, kocayemiş yaprak-etil alkol ekstraktında bulunmuştur. Kocayemiş meyvesinde, karotenoid miktarının kuru ağırlığın mg'ı başına düşen % toplam karotenoid miktarının %4,46 olduğu belirlenmiştir.

Linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu kullanılarak lipid peroksidasyonunu inhibe etme değeri için, ekstraktlar içinde en yüksek değer ise kocayemiş yaprak-etil alkol (%45,71±0,34) ekstraktında gözlenmiştir.

LC-MS/MS ile fenolik madde miktarı analizinde, kocayemiş meyvesinde su ve etil alkol ekstraktlarında, en yüksek fenolik madde konsantrasyonlarının; gallik asit, izohamnetin, quersetinde olduğu, kocayemiş yaprağının etil alkol ekstraktında ise en yüksek fenolik madde konsantrasyonunun kuersetinde olduğu bulunmuştur.

Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) meyvelerinden ve yaprağından elde edilen tüm ekstraktların antioksidan aktivite gösterdiği, kocayemiş meyvelerinin ve yaprağının doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği, üretiminin teşvik edilerek insanların direkt tüketebileceği, *in vivo* çalışmalarla desteklenerek eczacılık alanında faydalı çalışmalar yapılabileceği, sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Arbutus unedo* L., antioksidan aktivite, bioaktif bileşenler, fenolik bileşikler, DPPH, ABTS

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2019/162.

DETERMINATION OF *ARBUTUS UNEDO* L. FRUIT AND LEAVES' COMPOUNDS

SUMMARY

The antioxidant activity of arbutus berry (*Arbutus unedo* L.) fruit and leaf and phenolic substance amount and types in water and ethyl alcohol extracts were examined using different concentrations and methods.

The highest extract yield of erbutus berry was in fruit – water. (483,44 mg/g) The highest total phenolic compaund and total flavonoid contents were found in the ethyl alcohol extract.

Comparing otherextracts of arbutus berry, the highest chelating activity of ferric (II) ions was observed in ethyl alcohol extract. In determination of H₂O₂ clearance activity, the highest rate was in fruit – water extract of arbutus berry.

In determining the superoxide anion radical clearance activity, the highest rate was identified in the arbutus berry fruit – ethyl alcohol extract among the other extracts. From the perspective of radical DPPH• clearance activity, the highest activity was observed in arbutus berry fruit – ethyl alcohol extract among the other extracts.

In determination of ABTS•⁺ clearance activity, the highest activity was observed in arbutus berry fruit – water extract among other extarcts of the fruit.

In determination of total ferric ions (Fe³⁺) reduction capacity, the highest capacity was found in arbutus berry leaf – ethyl alcohol extract. In determining carotenoid content in arbutus berry fruit, it is identified to contain % 4,46 per mg of dry weigh.

As for the rate of lipid peroxidation inhibition by using the ferric thiocyanate method in linoleic acid system, the highest score was observed in arbutus berry fruit – ethyl alcohol extract ($45,71 \pm 0,34$) among the other extracts.

In the analysis of phenolic substance matter by LC-MS/MS it is determined that the water and ethyl alcohol extracts in arbutus berry, the highest phenolic substance concentrations were gallic acid, isohamnetin and quercetin, in leaf and ethyl alcohol extract the highest phenolic substance concentration was found as quercetin.

It was concluded that all the extracts obtained from arbutus berry fruit and leaf have antioxidant activity and both can be used as natural antioxidant sources. In addition to these by supporting the production people can use it directly or by strengthening with “in vivo” works in pharmaceuticals, functional activities can be achievable.

Key words: *Arbutus unedo* L., antioxidant activity, bioactive compounds, DPPH, ABTS.

KAYNAKLAR

1. Harborne I. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press: London etc:1982;278:388-91.
2. Sürücüoğlu MS, Barut Uyar B. Besinlerdeki biyolojik aktif bileşikler. Beslenme ve Diyet Dergisi / J Nutr and Diet. 2010;38(1-2):69-76.
3. Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest radikaller. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 2016;4(1):50-9.
4. Durak İ, Akpoyraz M. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. Ankara Tıp Mecmuası. 1995;48:253-62.
5. Halliwell B. Free radicals and antioxidants. Nutrition Reviews. 1994;52(8):253-68.
6. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları.Konya.
7. Kayış T. Diazino'nun subletal konsantrasyonlarının *Pimpla turionellae* L.'nın eşey oranı ve bazı biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri (tez). Adana: Çukurova Üniversitesi; 2010.
8. Ayvaz S. N-Asetil sisteinin instestinal iskemi reperfüzyon hasarına etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2005.
9. Kavas G. Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. Ankara Tıp Mecmuası 1994;47:579-92.
10. Ekici L, Sağdıç O. Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu. Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri. 2008;33(5):251-60.

11. Yılmaz İA. Mesane kanseri olguları ile plazma protein oksidasyonu arasındaki ilişki (tez). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Biyokimya ABD; 2001.
12. Çağatay U, Kayalı R. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi dergisi 2006;37:162-67.
13. Kumar V, Abbas, Aster. Robins Temel Patoloji. Tuzlalı S, Güllüoğlu M (Editörler). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2014. s.910.
14. Güzey İ. Afyon endemiği sideritis akmanii türünün serbest radikal giderici toplam fenolik madde miktarı, total antioksidan ve oksidan statüsü ile mineral madde içeriğinden incelenmesi (tez). Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2017.
15. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. Dicle Tıp Fakültesi Dergisi 2005;3:30-9.
16. Akagün G. Alabaş bitkisinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat fakültesi; 2009.
17. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular Antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. Food and Chemical Toxicology,1999;37:949-62.
18. Zamocky M, Koller F. Progress in Biophys. Mol. Biol.1999;72:19-66.
19. Storey BK. Oxidative stres: animal adaptations in nature. Brazil. J. Med. Biol. Res. 1996;29:1715-33.
20. Yazıcı C, Köse K. Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü. Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi 2004; 13(2):6-65.
21. Burtis CA, Ashwood ER. Klinik Kimyada Temel İlkeler. Aslan D (Editör). Ankara: Palme Yayınları; 2005.
22. Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 1996;27(1):41-50.
23. Bajpai VK, Baek KH, Kang SC. Antioxidant and free radical scavenging activities of taxoquinane, a diterpenoid isolated from Metasequoia glyptostroboides. South African Journal of Botany 2017;111:93-8.
24. Kasnak C, Palamutoğlu R. Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 2015;3(5):226-34.
25. Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evanj CA. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications 2000;277(3):535-40.

26. Diplock A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients, ILSI Europe Consie Monograph Series, Belgium: 1998;59.
27. Raytop T. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Ankara: Atatürk Kültür Yüksek Kurumu Türk Dil Kurumu Yayınları; 2007.
28. Pekdemir M. Espiye ve Bulancak ilçelerinde (Giresun) yetişen kocayemişlerin (*Arbutus unedo* L.) fenolojik ve pomolojik özellikleri (tez). Ordu Üniversitesi; 2010.
29. İslam A, Pehlivan NF. Marmara adasında yetişen kocayemişlerin (*Arbutus unedo* L.) pomolojik özellikleri. Akademik Ziraat Dergisi 2016;5:13-20.
30. Males Z, Plazibat M, Vundac V, Zuntar I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). Department of Botany Faculty of Science University of Zagreb 2006;56:245-50.
31. Chen W, Zhou S, Zheng X. A new function of Chinese bayberry extract: Protection against oxidative DNA damage. Food Science and Technology 2015;60:1200-5.
32. Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira J. *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. Journal of Food and Nutrition Research 2011;50:73-85.
33. Şeker M, Yücel Z, Nurdan E. Çanakkale yöresi doğal florasında bulunan Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) populasyonunun morfolojik ve pomolojik özelliklerinin incelenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi 2004;10(4):422-27.
34. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture 1977;28:49-55.
35. Rival SG, Boerriu CG, Wichers HJ. Caseins and casein hydrolysates antioxidative properties and relevance to lipooxygenase inhibition. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001;49:295-302.
36. Duh PD, Yen GC, Yen WJ, Chang LW. Antioxidant effects of water extracts from barley (*hordeum vulgare* L.) prepared under different roasting temperatures. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001;49:1455-63.
37. Zhishan J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical, Food Chemistry 1999;64:555-9.
38. Ruch RJ, Cheng SJ, Klauning JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, Carcinogenesis.1989;10(6):1003-8.

39. Nishimiki M, Rao NA, Yogi K. The accuracy of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1972;46(2):849-54.
40. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 1958;1199-200.
41. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2004;26:211-9.
42. Birnboim HC, Kanabus KM. The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide anion involve a metabolic process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985;82:6820-4.
43. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:1841-56.
44. Yong M, Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pamola A. Antioxidants activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26:1231-7.
45. Grdl F. *Tıbbi Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2019. s.514-4.
46. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition* 1986;44:307-15.
47. Mathew S, Abraham TE. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry* 2006;94:520-8.
48. Alasalvar C, Quantick P, Farsi M, Wiktorowicz R. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready to eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry* 2005;89:69-76.
49. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. Antioxidative Action of Indole Compounds During The Autoxidation of Linoleic Acid. *Eiyoto Shokuryo* 1966;19:210-4.
50. Dinçel A, Eser B. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Journal of Health Services and Education* 2017;2(2):51-7.
51. Bayram NE, Canlı D, Gerçek YC, Bayram S, Çelik S, Güzel F, Morgil H, Öz CG. Macronutrient and micronutrient levels and phenolic compound characteristics of monofloral honey samples. *Journal of Food and Nutrition Research* 2020;59(4):311-22.

52. Moualek I, Aiche GT, Giechaoui NM, Lahcene S, Havalı K. Antioxidant and anti inflammatory activities of *Arbutus Unedo* aqueous extract. Asian Pac. J. Trop Biomed 2016;6(11):937-44.
53. Koyu H, Koyu BE, Demir S, Baykan Ş. *Arbutus Unedo* L. Türk Farmokope Dergisi 2019;4(3):29-51.
54. Orak HH, Yağar H, İşbilir SS, Demirci AŞ, Gümüş T, Ekinci N. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Potential of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf. Food Sci. Biotechnol 2011;20(5):1249-56.
55. Sakaldaş A. Çanakkale doğal florasında bulunan Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.)'in pomolojik, enolojik ve biyokimyasal özelliklerinin aylık değişimlerinin incelenmesi (tez). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi; 2012.
56. Mangan B. Karadut meyve ve yapraklarının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi (tez). Trakya Üniv. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü; 2019.
57. Küçükyıldırım T. Beyaz dut ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi (tez). Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2017.
58. Erboğa A. Kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) bitkisi karbonhidrat ve fenolik bileşikler ile antioksidan etkilerinin incelenmesi (tez). Bartın Üniversitesi; 2016.
59. Orak HH, Aktaş T, Yağar H, İşbilir SŞ, Ekinci N, Şahin FH. Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). Fruit Food Science Technology International 2012;391-402.
60. Baysal T, Ersus S. Karotenoidler ve insan sağlığı. Gıda 1999;24(3):177-85.
61. Gülçin İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology 2005;217:213-20.
62. Ayaz FA, Küçükislamoğlu M, Reunanen M. Sugar, Non-volatile and Phenolic Acids Composition of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits. Journal of food Composition and Analysis 2000;13(2):171-7.
63. Erkekler Z, Plazibat M, Blundac VB, Zunter I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). Acta Pharm 2006;56(2):265-5.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Serbest radikallerin hücrede meydana getirdiği hasar.....	7
Şekil 2. Melatoninin yapısı.....	10
Şekil 3. Biluribin yapısı.....	11
Şekil 4. Glutasyon yapısı.....	11
Şekil 5. Ürik asit yapısı.....	11
Şekil 6. α - tokoferol (E Vitamini) yapısı.....	12
Şekil 7. Askorbik asidin yapısı.....	12
Şekil 8. β -karoten yapısı.....	13
Şekil 9. Likopen yapısı.....	13
Şekil 10. Kocayemiş (<i>Arbutus unedo</i> L) meyvesi.....	15
Şekil 11. Kocayemiş meyveleri.....	16
Şekil 12. Kocayemiş yaprakları.....	16
Şekil 13. DPPH radikalinin indirgenmesi.....	27
Şekil 14. LC-MS/MS(Agilent Technologies 6460 Triple Quad.).....	31
Şekil 15. Gallik asit standart grafiği.....	34
Şekil 16. Pirokateşol standart grafiği.....	35
Şekil 17. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik madde içerikleri.....	35
Şekil 18. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının pirokateşol eşdeğeri olarak fenolik madde içerikleri.....	36

Şekil 19. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri.....	37
Şekil 20. Gallik asit standart grafiği.....	38
Şekil 21. Kuersetin standart grafiği.....	39
Şekil 22. Kocayemiş ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri...	40
Şekil 23. Kocayemiş ekstraktlarının kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri...	40
Şekil 24. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların H ₂ O ₂ giderme aktiviteleri.....	41
Şekil 25. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri.....	42
Şekil 26. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların DPPH• radikali giderme aktiviteleri.....	43
Şekil 27. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların ABTS•+ radikali giderme aktiviteleri.....	45
Şekil 28. Kocayemiş meyve yaprak ekstraktlarının Fe ³⁺ 'ü Fe ²⁺ 'ye indirgeme kapasiteleri...	47
Şekil 29. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ile standartların linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi.....	49
Şekil 30. Kocayemiş meyve ve yaprak ekstraktları ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri.....	49
Şekil 31. Kocayemişin meyve-etil alkol ekstraktının spektrumu.....	57
Şekil 32. Kocayemişin meyve-su ekstraktının spektrumu.....	57
Şekil 33. Kocayemiş hidrolize edilmiş meyve-alkol ekstraktının spektrumu	57
Şekil 34. Kocayemişin hidrolize edilmiş meyve-su ekstraktının spektrumu.....	58
Şekil 35. Kocayemişin hidrolize edilmiş yaprak-etil alkol ekstraktının spektrumu.....	58
Şekil 36. Kocayemişin yaprak-etil alkol ekstraktının spektrumu.....	58

TABLÖLAR

Tablo 1. Bazı serbest reaktif türleri.....	3
Tablo 2. Kocayemişin ekstrakt verimleri.....	33
Tablo 3. Standartların farklı konsantrasyonlarının Demir (II) iyonlarını şelatlama kapasiteleri	37
Tablo 4. Kocayemiş meyve ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının Demir (II) iyonlarını şelatlama kapasiteleri.....	38

Tablo 5. Standartların farklı konsantrasyonlarının süperoksit radikali giderme aktiviteleri.....	42
Tablo 6. DPPH• radikali giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerinin radikal giderme aktiviteleri.....	44
Tablo 7. Kocayemiş ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktivitesi verilerinden yararlanılarak hesaplanan EC50 değerleri.....	44
Tablo 8. Standartların DPPH• radikali giderme aktivitesi verilerinden yararlanılarak hesaplanan EC ₅₀ değerleri.....	45
Tablo 9. Standart çözeltilerin ABTS•+ radikali giderme aktiviteleri(%).....	46
Tablo 10. Standart çözeltilerin Fe ³⁺ iyonlarını indirgeme kapasiteleri.....	47
Tablo 11. Kocayemişin meyve-etil alkol ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları.....	51
Tablo 12. Kocayemişin meyve-su ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları.....	52
Tablo 13. Kocayemişin hidroliz edilmiş meyve-etil alkol ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları.....	53
Tablo 14. Kocayemiş hidroliz edilmiş meyve-su ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları.....	54
Tablo 15. Kocayemişin hidrolize edilmiş yaprak-etil alkol ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları.....	55
Tablo 16. Kocayemişin yaprak-etil alkol ekstraktından elde edilen fenolik maddeler ve konsantrasyonları.....	56