



***HIPPOPHAE RHAMNOIDES* (ÇALI GAGASI)
VE *JUNİPERUS DRUPACEA* (ANDIZ)
BİTKİLERİNİN ÇEŞİTLİ EKSTRELERİNİN
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Metin ÇAPA
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Doktora Tezi-2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HİPPOPHAE RHAMNOİDES* (ÇALI GAGASI) VE
JUNİPERUS DRUPACEA (ANDIZ) BİTKİLERİNİN
ÇEŞİTLİ EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Metin ÇAPA

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**ERZURUM
2017**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**HİPPOPHAE RHAMNOİDES (ÇALI GAGASI) VE JUNİPERUS
DRUPACEA (ANDIZ) BİTKİLERİNİN ÇEŞİTLİ EKSTRELERİNİN
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Metin ÇAPA

Tez Savunma Tarihi : 18.12.2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Bekir BATI (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Sedef KIR (Hacettepe Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Hippophae Rhamnoides</i> ve <i>Juniperus Drupacea</i> Bitkilerinin Botanik Özellikleri	3
2.2. Serbest Radikaller	5
2.3. Lipidlerin Oksidasyonu	6
2.4. Antioksidanlar ve Sınıflandırılmaları	7
2.4.1. Doğal Antioksidanlar	7
2.4.2. Sentetik Antioksidanlar	8
2.5. Yapılan Çalışmalar	8
2.6. Spektroskopik Yöntemler	20
2.6.1. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi	21
2.6.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi	22
2.6.3. Işının Absorplanması ve Lambert-Beer Yasası	23
2.7. Kromatografik Yöntemler	24
2.7.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması	25
2.7.2. Kromatografinin Dayandığı Temel Olaylar	26
2.7.2.1. Dağılma Kromatografisi	27

2.7.2.2. Adsorbsiyon Kromatografisi.....	27
2.7.2.3. İyon Değişirme Kromatografisi.....	27
2.7.2.4. Eleme-Boyut Kromatografisi.....	28
2.8. HPLC	28
2.9. HPLC Uygulama Alanları	29
2.9.1. Kimyasal Ayırma.....	29
2.9.2. Saflaştırma.....	29
2.9.3. Kalitatif Analiz.....	30
2.9.4. Kantitatif Analiz.....	30
2.10. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri.....	30
2.10.1.Serbest Radikal GidermeYöntemi.....	32
2.10.2. İndirgeme Kuvveti Tayini	32
2.10.3. Metal İyonu Kelatlama Yöntemi.....	33
2.10.4. Flavonoid Miktarı Tayini	35
2.10.5. Fenolik Bileşik Miktarı Tayini.....	35
3. MATERYAL VE METOT.....	36
3.1.Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Maddeler ve Aletler.....	36
3.1.1.Bitkisel Materyal.....	36
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler.....	36
3.1.3. Alet ve Cihazlar.....	37
3.2. Deneysel Çalışmalar ve Metotlar.....	38
3.2.1. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	38
3.2.1.1. Radikal Giderme Aktivite Tayini İçin Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
3.2.1.2. İndirgem Kuvveti Tayini İçin Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
3.2.1.3. Metal İyonu Kelatlama Aktivite Tayini İçin Çözeltilerin Hazırlanması.....	39

3.2.1.4. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İçin Çözeltilerin Hazırlanması	39
3.2.2. Bitki Ekstrelerinin ve Hayvan Gruplarının Hazırlanması	39
3.2.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	39
3.2.2.2. Hayvan Gruplarının Hazırlanması Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	40
3.2.3. Spektrofotometrik Yöntem Çalışmaları	42
3.2.3.1. DPPH Radikal Giderme Tayini	42
3.2.3.2. İndirgeme Kuvveti Tayini	42
3.2.3.3. Metal İyonları Kelatlama Aktivite Tayini	43
3.2.3.4. Toplam Fenolik Bileşiklerin Tayini	43
3.2.4. Kromatografik Yöntem Çalışmaları	43
4. BULGULAR	45
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemleri	45
4.1.1. Radikal Giderme	45
4.1.2.İndirgeme Kuvveti	47
4.1.3. Metal İyonu Kelatlama Aktivitesi	49
4.1.4. Fenolik Bileşik Miktarı	51
4.2. Kromatografik Yöntemleri	52
4.2.1. HPLC Yöntemi	52
4.2.1.1. Standart Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	52
4.2.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	55
4.2.2. HPLC Doku Çalışması	60
4.2.2.1. Doku Çözeltilerinin Hazırlanması ve Analizi	60
4.2.2.2. Yöntem Geçerlilik Testleri ve Sonuçlar (Validasyon)	63
4.3. Gerçek Numunelerde-Hayvan Dokularında α -Tokoferol ve Retinol Analizleri	69

4.4. Biyokimyasal Çalışmalar.....	70
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR.....	86
EKLER.....	100
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	100
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	101
EK-3. ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARI.....	102
EK-4. DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI.....	104

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten tezimin her aşamasında, lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca fikirlerini, ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na en derin saygı, şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince yardımlarını, anlayışını ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU'na, Doç. Dr. Alptuğ ATİLA'ya, Yrd. Doç. Dr. Onur ŞENOL'a ve Arş. Gör. M. Emrah YAMAN 'a, (Atatürk Üniversitesi, Erzurum) Hayvan deney çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Öğretim Üyeleri Doç.Dr. Yasin BAYIR, Doç.Dr. Elif ÇADIRCI ve Doç. Dr. Beyzagül POLAT'a (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), beni sadece tez çalışmalarımda değil tüm yaşantımda yalnız bırakmayan aileme ve eşime teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Metin ÇAPA

ÖZET

***Hippophae Rhamnoides* (Çalı Gagası) ve *Juniperus Drupacea* (Andız) Bitkilerinin Çeşitli Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması**

Amaç: Bu çalışmada, Mersin yöresinde yetişen *Juniperus Drupacea* ve Erzurum yöresinde yetişen *Hippophae Rhamnoides* bitkilerinin meyve kısımlarından elde edilmiş farklı polarlıktaki çözücü sistemlerindeki ekstrelerinin antioksidan özelliklerinin ve ratlardaki karaciğer toksisitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Antioksidan aktivite analizlerinde, radikal giderme yöntemi, indirgeme kuvveti yöntemi ve metal kelatlama yöntemleri kullanıldı. Örneklerin toplam fenolik bileşik miktar tayinleri de folin ciocalteu reaktifi kullanılarak yapıldı. Rat karaciğerinde α -tokoferol ve retinol miktar tayinlerinde UV ve floresans dedektörlü HPLC yöntemi kullanıldı. HPLC’de gradient elüsyon, metanol/asetonitril/su oranlarından oluşan hareketli faz, C₁₈ kolon, 1 mL/dk akış hızı ve 10 μ L enjeksiyon hacmi çalışma parametreleri kullanıldı.

Bulgular: Analizlerde kullanılan yöntemler geliştirilip yöntem geçerlilik testleri yapıldı. Her üç yöntemin doğruluk (% BH) değerleri % 4.80’dan ve kesinlik (% BSS) değerleri % 8.42’den küçük, dokudan analitik geri kazanım değerleri % 104.80-% 92.467; α -tokoferol ve retinolün UV ve floresans dedektörlü yöntem için LOD değerleri sırasıyla 0.220-0.053 μ g/mL ve 0.025-0.050 μ g/mL, LOQ değerleri ise sırasıyla 0.712-0.150 μ g/mL ve 0.100-0.257 μ g/mL olarak belirlendi.

Sonuç: *Juniperus Drupacea* ve *Hippophae Rhamnoides* bitki ekstrelerinin bu çalışmamızda belirli derecede antioksidan aktivite gösterdikleri, özellikle andızın eterdeki ve çalı gagasının sudaki ekstrelerinin karaciğer hasarını azaltmada etkili oldukları tespit edildi. Antioksidan oldukları bilinen ve karaciğer dokularında bulunan α -tokoferol ve retinolün HPLC-UV ve floresans dedektör kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılabileceği ve bu vitaminlerle ilgili ileride doku ile ilgili yapılacak çalışmalarda bu yöntemlerin kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, *hippophae rhamnoides*, HPLC, *juniperus drupacea*.

ABSTRACT

Investigation that Antioxidant Activity of Various Extracts of *Hippophae Rhamnoides* and *Juniperus Drupacea*

Aim: It was aimed to determine antioxidant activity of fruit parts of plants which are the *Juniperus Drupacea* grown in Mersin region and *Hippophae Rhamnoides* grown in Erzurum region and their effects on liver toxicity in rats.

Material and Method: Radical scavenging, electron reducing power and metal chelating methods were used in antioxidant activity analysis. Total phenolic content quantitation were carried out by folin-ciocalteu reagent. In quantitative determination of α -tokoferol and retinol, HPLC- UV-Visible and fluorescence detectors were used in rat liver samples. HPLC instrument. Gradient elution, methanol/acetonitrile/water mobile phase mixture, C₁₈ column, 1 mL/min flow rate and 10 μ L injection volume parameters were preferred for analysis.

Results: UV-Görünür Bölge Spectrophotometer and HPLC methods developed after method validation tests were performed. Accuracy of the three methods (% BH) values of % 4.80 and precision (% RSD) values less than % 8.42. It was determined average analytical recovery value from tissue using UV detector and fluorescence detector respectively, % 104.80 and % 92.467. HPLC method with UV, fluorescence detectors for tocopherol and retinol LOD values respectively, 0.220-0.053 and 0.025-0.050 μ g/mL LOQ values were 0.712-0.150 and 0.100-0.257 μ g/mL was detected.

Conclusion: It was detected that *Juniperus Drupacea* and *Hippophae Rhamnoides* extracts show certain degree of antioxidant activity, particularly *Juniperus Drupacea* ether and *Hippophae Rhamnoides* water extract to be effective in liver damage. As antioxidants are known and found in liver tissue α -tocopherol, retinol in the blood of our appreciation of the qualitative and quantitative analysis can be done using HPLC-UV and fluorescence.

Key Words: Antioxidant activity, *hippophae rhamnoides*, HPLC, *juniperus drupacea*.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Absorbans
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ASE	: Eşdeğer Askorbik Asit
AST	: Aspartat Aminotransferaz
AOA	: Antioksidan Aktivite
BH	: Bağlı Hata
BHA	: Bütillenmiş Hidroksi Anizol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluene
BPRS	: Kısa Psikiyatrik Değerlendirme Ölçeği
BSS	: Bağlı Standart Sapma
cm	: Santimetre
ÇA	: Çalışma Aralığı
DNA	: Deoksi Ribo Nükleik Asit
DPPH	: 1-1 difenil 2- pikril hidrazil
dk	: Dakika
λ	: Dalga Boyu
EDTA	: Etilendiamintetrasetik Asit
FCR	: Folin Ciocalteu Reaktifi
FRAP	: Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
g	: Gram
GAE	: Galik Aside Eş Değer
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi

GC-MS/MS	: Gaz Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi
GK	: Geri Kazanım
h	: Hacim
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
H.R.	: <i>Hippophae Rhamnoides</i> (Çalı Gagası)
IC₅₀	: % 50 Azalmaya Neden Olan Derişim
IM	: İntramüsküler
IR	: İnfrared
IS	: İnternal Standart
J.D.	: <i>Juniperus Drupacea</i> (Andız Bitkisi)
Jom	: <i>Juniperus Oxycedrus</i> L. Macrocarpa
Joo	: <i>Juniperus Oxycedrus</i>
L	: Litre
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi
LDL-C	: Düşük Dansisiteli Lipoprotein Kolesterol
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Miktar Tayin Alt Sınırı
LR	: Lineer Regresyon
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre

mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
M	: Molarite
ng	: Nanogram
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PG	: Propil Gallat
PRF	: Fenolik Yüksek Fraksiyonları
R	: Korelasyon Katsayısı
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
°C	: Santigrat Derece
S_a	: Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması
S_b	: Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması
SS	: Standart Sapma
S/G	: Sinyal/Gürültü Oranı
T	: Geçirgenlik
TC	: Total Kolesterol
TBHQ	: Tersiyer Bütil Hidrokinon
TFA	: Trifloro Asetik Asit
TG	: Trigliserit
UV	: Ultra Viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. <i>Hippophae Rhamnoides</i> bitkisi.....	4
Şekil 2.2. <i>Juniperus Drupacea</i> bitkisi.....	4
Şekil 2.3. Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar.....	7
Şekil 2.4. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması.....	21
Şekil 2.5. Bir molekülde elektronik, titreşim ve dönme enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı.....	22
Şekil 2.6. Absorblayan bir çözeltiye giren ışının P_0 şiddetinde girişi ve P şiddetinde çıkışı.....	23
Şekil 2.7. Kromatografinin hareketli ve sabit faza göre sınıflandırılması.....	25
Şekil 2.8. Tek bir bileşik için tipik bir kromatogram.....	26
Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi.....	29
Şekil 2.10. DPPH'nin molekül yapısı.....	33
Şekil 3.1. <i>J.D.</i> ve <i>H.R.</i> bitkilerinin ekstraksiyon şeması.....	40
Şekil 4.1. <i>H.R.</i> bitkisinin eter, etanol, su ekstraktları ile standartların serbest radikal giderme aktiviteleri.....	46
Şekil 4.2. <i>J.D.</i> bitkisinin eter, etanol, su ekstraktları ile standartların serbest radikal giderme aktiviteleri.....	46
Şekil 4.3. Askorbik Asit, BHA ve α -tokoferol ile <i>H.R.</i> ve <i>J.D.</i> bitkilerinin eter, etanol ve su ekstraktlarının serbest radikali giderme aktiviteleri.....	47
Şekil 4.4. <i>H.R.</i> bitkisi eter, etanol ve su ekstraktları indirgeme kuvvetlerinin derişime bağlılığı.....	48
Şekil 4.5. <i>J.D.</i> bitkisi eter, etanol ve su ekstraktlarının indirgeme kuvvetlerinin derişime bağlılığı.....	48

Şekil 4.6. Retinol, α -tokoferol ile J.D. ve H.R.bitkilerinin eter, etanol ve su ekstrelerinin 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerdeki indirgeme kuvvetleri.....	49
Şekil 4.7. J.D. bitkisinin eter, etanol ve su ekstrelerinin Fe^{2+} iyonlarını kelatlama aktiviteleri.....	50
Şekil 4.8. H.R. bitkisinin eter, etanol ve su ekstrelerinin Fe^{2+} iyonlarını kelatlama aktiviteleri.....	50
Şekil 4.9. H.R ve J.D. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstrelerinin 5 mg/mL derişimde Fe^{2+} iyonlarını kelatlama aktiviteleri.....	51
Şekil 4.10. Gallik asidin standart eğrisi.....	51
Şekil 4.11. 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimde IS içeren 10 $\mu\text{g/mL}$ α -tokoferol standart çalışma çözeltisinin HPLC-UV kromatogramı.....	53
Şekil 4.12. 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimde IS içeren 10 $\mu\text{g/mL}$ α -tokoferol standart çalışma çözeltisinin HPLC- Floresan kromatogramı.....	53
Şekil 4.13. 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimde IS içeren 10 $\mu\text{g/mL}$ retinol standart çalışma çözeltisinin HPLC-UV kromatogramı.....	54
Şekil 4.14. 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimde IS içeren 10 $\mu\text{g/mL}$ retinol standart çalışma çözeltisinin HPLC-Floresans kromatogramı.....	54
Şekil 4.15. HPLC-Floresans yöntemi ile elde edilen α -tokoferol standart Çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.....	55
Şekil 4.16. HPLC-UV yöntemi ile elde edilen α -tokoferol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 4.17. HPLC-Floresans yöntemi ile elde edilen retinol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 4.18. HPLC-UV yöntemi ile elde edilen retinol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.....	57

Şekil 4.19. 200 µg/mL derişimde IS ve 10 µg/mL derişimdeki retinol içeren doku çözeltilerinin ekstraksiyonu sonucu HPLC-UV kromatogramı..	60
Şekil 4.20. 200 µg/mL derişimde IS ve 10 µg/mL derişimdeki retinol içeren doku çözeltilerinin ekstraksiyonu sonucu HPLC-Floresans kromatogramı.....	61
Şekil 4.21. 200 µg/mL derişimde IS ve 30 µg/mL derişimdeki α-tokoferol içeren doku çözeltilerinin ekstraksiyonu sonucu HPLC-Floresans kromatogramı.....	61
Şekil 4.22. 200 µg/mL derişimde IS ve 30 µg/mL derişimdeki α-tokoferol içeren doku çözeltilerinin ekstraksiyonu sonucu HPLC-UV kromatogramı.....	62
Şekil 4.23. Kontrol grubu dokunun HPLC-UV kromatogramı.....	61
Şekil 4.24. Doku çalışmasında HPLC-Floresans yöntemi ile elde edilen retinol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.....	63
Şekil 4.25. Doku çalışmasında HPLC-UV yöntemi ile elde edilen retinol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 4.26. Doku çalışmasında HPLC-Floresans yöntemi ile elde edilen α-tokoferol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 4.27. Doku çalışmasında HPLC-UV yöntemi ile elde edilen α-tokoferol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.....	65

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Karakteristik Serbest Radikaller.....	6
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	36
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	37
Tablo 3.3. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması.....	41
Tablo 3.4. HPLC Yöntem Şartları	44
Tablo 4.1. H.R. ve J.D. Bitkilerinin Eter, Etanol ve Su Ekstreleri İle Standartların (α -tokoferol, BHA, Askorbik Asit) 100 μ g /mL DPPH Giderme Aktivitesi (n=6).....	45
Tablo 4.2. J.D. ve H.R. Bitkilerinin Eter, Tanol ve Su Ekstrelerinin İndirgeme Kuvveti Değerleri (n=6).....	47
Tablo 4.3. J.D. ve H.R. Bitkilerinin Eter, Etanol ve Su Ekstrelerinin Fe ⁺² İyonlarını Kelatlama Aktiviteleri (n=6).....	49
Tablo 4.4. H.R. ve J.D. Bitkilerinin Eter, Etanol ve Su Ekstrelerinin Fenolik Bileşiklerinin Eşdeğer Gallik Asit Olarak Miktarı (n=6).....	52
Tablo 4.5. α -Tokoferol Ve Retinol Standart Maddeleri İle Hazırlanan Standart Çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerine ait istatistiksel analiz Değerleri.....	58
Tablo 4.6. Retinol İçin HPLC-UV Yönteminin Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.	59
Tablo 4.7. Retinol İçin HPLC-Floresans Yönteminin Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	59
Tablo 4.8. α -Tokoferol İçin HPLC-Floresans Yönteminin Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	59

Tablo 4.9. α -Tokoferol İçin HPLC-UV Yönteminin Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	60
Tablo 4.10. Doku Örneklerinden Ekstrakte Edilen - α -Tokoferol ve Retinol İçin Hazırlanan Kalibrasyon Eğrilerine Ait İstatistiksel Analiz Değerleri.....	65
Tablo 4.11. Doku Örneklerinde Retinol İçin HPL- Floresans Yönteminin Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	67
Tablo 4.12. Doku Örneklerinde Retinol İçin , HPLC-UV Yönteminin Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	67
Tablo 4.13. Doku Örneklerinde α -Tokoferol İçin HPLC-Floresans Yönteminin Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	68
Tablo 4.14. Doku Örneklerinde α -Tokoferol İçin HPLC-UV Yönteminin Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	68
Tablo 4.15. Hayvan Gruplarında Retinol ve α -Tokoferol Analiz Sonuçları.....	69
Tablo 4.16. Hayvan Deney Gruplarının ALT ve AST Bulguları.....	70

1. GİRİŞ

Bitkilerin tedavi amacıyla kullanılması ilk uygarlıklara kadar uzanmaktadır. Dünya üzerinde yetişen 250.000 çiçekli bitkinin bugüne kadar yaklaşık %5-10'u etken madde bakımından araştırılmıştır.¹ Ülkemiz florasında yaklaşık 8500 bitki türü yetişmekte ve bunlardan yalnız 650 kadarı tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Henüz bu bitkilerin antioksidan bileşik varlığı yönünden düzenli olarak incelenmesi yapılmamıştır. Bitkilerde bulunan bazı doğal kimyasallar insan organizması için tehlikesiz antioksidanlar olarak daha çok dikkat çekmekte ve bunlara karşı olan talep artmaktadır. Çünkü bu bitkiler çok eskilerden bu yana insanlar ve hayvanlar tarafından tüketilmektedirler.²

Aktif oksijen türleri olan süperoksit ($O_2^{\bullet}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$) normal metabolizmanın yan ürünleridirler. Bu reaktif oksijen türlerinin zararlı etkisi olduğu bilinmektedir. Bunlar lipidler, proteinler, enzimler, Deoksi Ribonükleik Asit (DNA) ve Ribonükleik Asit (RNA) gibi biyomoleküllere atak yaparak bir seri dejeneratif hasarlara neden olurlar.³⁻⁵ DNA hasarı ise kanser oluşumunun en önemli faktörlerinden biridir.⁶ Lipidlerin peroksidasyonu ile yaşlanma, kanser, diabet, kalp-damar hastalıklarını da içine alan çok sayıda dejeneratif hastalıklar arasında belirli bir ilişki vardır.⁷⁻¹⁰ Bu sebeple, lipidlerin peroksidasyonunun önemli inhibitörü olan antioksidanlara, yalnız besin ürünlerinin değil, aynı zamanda canlı hücrelerin de oksidatif zedelenmelerine karşı önemli koruyucuları olarak bakılmaktadır. Oksidasyonu önlemek için besin endüstrisinde bütillenmiş hidroksianizol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyer bütıl hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) gibi sentetik antioksidanlar daha ucuz ve etkili oldukları için kullanılırlar. Ancak BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların karsinojenik oldukları düşünüldüğü için bunların besinlerin korunmasında kullanılmaları sınırlandırılmıştır.¹¹ Bu yüzden son yıllarda

özellikle bitki kökenli antioksidan kaynaklarının kullanımında büyük bir artış vardır.¹²

Bu doğal antioksidanlar bilimsel araştırmalarda önemli bir yer tutmaya başlamıştır.¹³

Bazı bitkilerin iyi bilinen antioksidan bileşikler olan vitamin C, vitamin E ve karotenoidleri sentezleme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir. Bu doğal antioksidanlar biyolojik sistemlerde DNA, proteinler ve membran lipidlerini oksitleştirici hasarlardan koruyarak ve hastalıkları önleyerek insan sağlığına daha fazla katkıda bulunabilirler.¹⁴ Ancak doğal flora bitkilerinin çok az miktarı antioksidan belirleme yönünden incelenmiştir. Bu çalışmamızda doğal antioksidan kaynaklarını araştırmaya katkıda bulunmak amacıyla ülkemizde Mersin yöresinde yetişen andız (*Juniperus Drupacea*) ve Erzurum yöresinde yetişen çalı gagası (*Hippophae Rhamnoides*) bitkileri seçilmiştir.

Bitki ekstralarının antioksidan aktivitelerini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu sistemde oluşturulan radikal türlerinin antioksidanlar varlığında ortadan kaldırılmasına dayanan yöntemlerdir.¹⁵ Bu çalışmamızda, radikal giderme yöntemiyle birlikte bu yöntemi destekleyen indirgeme kuvveti ve oksidasyon sürecini hızlandıran metal iyonlarını kelatlama aktivitesi ölçümlerini de yapmak istedik. Bu aktivitelerin kaynağı olarak bitkilerdeki fenolik bileşikler düşünülebileceğinden fenolik bileşik miktar tayini yapılarak çalışmamızın güvenilirliği artırılmaya çalışılmıştır.

Biz çalışmamızda *Juniperus Drupacea* (J.D.) ve *Hippophae Rhamnoides* (H.R.) bitkilerinin çeşitli çözücü sistemlerindeki ekstralarının antioksidan özelliklerinin ve ratlardaki karaciğer toksisitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi ve ayrıca antioksidan aktivite gösteren vitamin E ile vitamin A'nın dokuda HPLC ile eş zamanlı olarak analizinin yapılması amaçlanmıştır. Ekstrelerin aktiviteleri standart antioksidanların (BHA, vitamin C, vitamin E) aktiviteleri ile karşılaştırılarak ne ölçüde etkili ve yeterli olduklarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Hippophae Rhamnoides* ve *Juniperus Drupacea* Bitkilerinin Botanik

Özellikleri

Elaeagnaceae familyası üç cins, *Elaeagnus* L., *Hippophae* L. ve *Shepherdia* içerir. *Elaeagnus* cinsinin yaklaşık 45 tanımlanmış türü vardır ve *Elaeagnus*, Kuzey Amerika ve Avrasya boyunca bulunur. Bazı türler Avustralya ve Batı Kuzey Amerika'da da yetişmektedir. *Hippophae* cinsinin 3 türü ve *Shepherdia* cinsinin de 3 türü bulunmaktadır. *Hippophae Rhamnoides*, *Hippophae* cinsinin alt türüdür. *Myrtflores-Thymelaelas* takımında *Elaeagnaceae* familyası üyesi *Hippophae Rhamnoides* Türkiye'de yaklaşık 2000 m rakımda değişik iklim şartlarında yetişir (Şekil 2.1). Bitkinin yöresel isimleri; çışkan, çalı gagası (Erzurum), cıcılık, yalancı iğde, çıçırgan, çay çalısı, (İlgaz) ve Sincan çalısıdır (Sivas). Tohumla ve vegetatif çoğalmayla basitçe kültüre alınır. Eğimli kısımlarda toprağı tutma kabiliyeti ile kumlu kısımlarda ise rüzgâr etkisi ile kumul kütle ilerlemesini durdurabilir. Kök kısımlarında azot içeren mikroorganizmaları vardır, bu sebepten çakıl ve kumların da bulunduğu kurak derelerde de yetişebilir. Bitki topraktaki çözünmeyen organik ve mineral bileşikleri daha çözünebilir maddelere dönüştürebilir. H.R. 10 m yükseklikte, kış aylarında yaprakları dökülen, dikenli bir bitkidir. Yaprakları ince, sapı olmayan, 3 ila 6 cm uzunlukta, gri renkli, meyveleri 3 ile 7 mm boyutunda, turuncu renkli tek tohumlu, tadı ise ekşidir. Yaprakları boğumlu, üst kısmı koyu yeşil-gri, alt kısmı sarımsı veya beyazdır, parlaktır. Küçük çekirdekli meyvesinin rengi sarımsı veya kırmızı, tadı ekşimsidir. Meyvesi sıralı, yumuşak ve kolay ezilebilir. Ham madde için olgunlaşmış meyvesi toplanır. Meyveleri soğuk havada (-15°C) çırpılma suretiyle toplanır. Bu bitkiler A, E, C ve B gurubu vitaminleri, flavonik glikozitleri, karotenleri ve organik asit türevlerini (malik asit vb.) içerir.¹⁶



Şekil 2.1. *Hippophae Rhamnoides* bitkisi.¹⁷

Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, çalı gagası bitkisinde özellikle vitamin, flavonoid, yağ ve aminoasit içerikli madde varlığı tespit edilmiştir. Toplumda çeşitli amaçla kullanılan H.R.'nin deri, bağırsak, mide ve yel hastalıklarında, avitaminozda, kötü huylu şişlerin iyileşmesinde kullanımları da literatürde yer almaktadır.¹⁸



Şekil 2.2. *Juniperus Drupacea* bitkisi.¹⁹

Andız, *Cupressaceae* (Pul yapraklılar) ailesi üyesidir. Pul yapraklılar ailesi; çok dallanan, sürekli yeşil, küçük ağaç veya yerde bulunan çalılar halindeki bitkilerdir (Şekil.2.2). Bazılarında yapraklar iğne, bazılarında ise pul şeklindedir. Diğer familyalardan farklı olarak sürgünlere karşılıklı olarak yerleşmişlerdir. Hiçbir türün odununda reçine kanalı yoktur. Pul yapraklılar kozalak ve sürgün yapıları açısından *Juniperoideae*, *Cupressoideae* ve *Thujoideae* diye 3 alt ailede sınıflandırılır. Andız cinsi, *Juniperoideae* alt ailesindendir. Andız, bir cinsli, erkek ve dişi çiçekleri farklı ağaçlarda yer alan bir ağaç cinsidir. Bazı botanikçiler andızı ardıçların (*Juniperus L.*) üyesi olarak kabul ederler. Ancak tohumların serbest olmayışı kozalak yapısı ve pullarla örtülü tomurcuklara sahip olması nedeniyle ardıçlardan farklıdırlar. Andız, cinsinde yaşayan tek türdür. Andız; 25 m uzunluk ve 50 cm yarıçapa ulaşabilen, genellikle piramidal tepe formuna sahip bir orman ağacıdır. Yumurta şeklindeki tomurcukları sivri pullarla kaplıdır. Boyları 1-2.5 cm aralığında olan geniş iğne şeklindeki yapraklarının uç kısımları batıcı ve sivridir. Üst kısımlarında yoğun iki beyaz stoma bandı bulunur. Dişi çiçekler üçerli çevresel dizilmiş fazlaca pullardan meydana gelmiştir. Kozalaklar oldukça büyüktür (2-2.5 cm) ve ikinci yılda olgunlaşır.

2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir ya da birden çok eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronun varlığından dolayı oldukça aktiflerdir.

Biyolojik sistemlerde yer alan en önemli serbest radikaller, reaktif oksijen türleri olan radikallerdir. Oksijenin elektronlarının ikisi eşleşmemiştir. Bu sebeple oksijen bazen bir diradikal gibi değerlendirilmektedir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal dışındaki maddelerle ise

reaksiyona girme eğilimi daha azdır. Oksidasyon sürecinde oluşan karakteristik serbest radikaller Tablo 2.1’de sunulmuştur.

Tablo 2.1. Karakteristik serbest radikaller

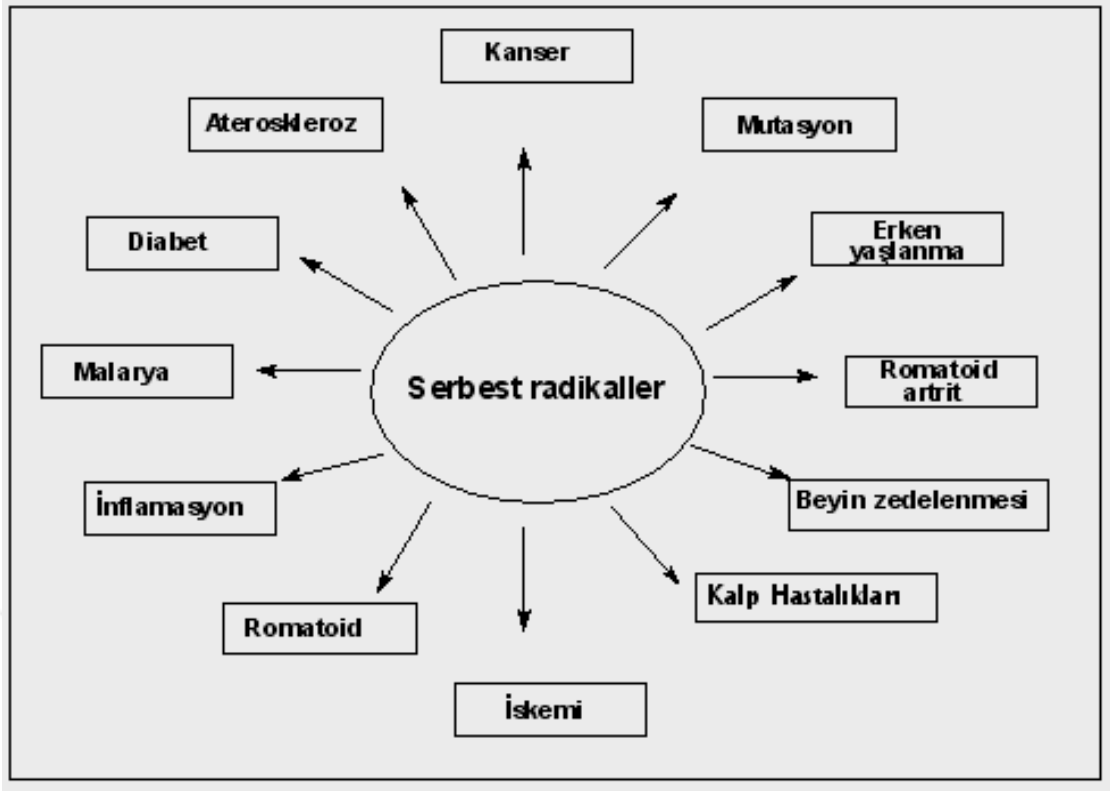
Oksidasyon Sürecindeki Karakteristik Serbest Radikaller	
■ $H^{\bullet}$ – Hidrojen atomu	En basit serbest radikal
■ $HO^{\bullet}$ – Hidroksil	Oksijen-merkezli yüksek aktiviteli radikal, vücuttaki tüm moleküllere saldırır.
■ $ROO^{\bullet}$ – Peroksil	Oksijen-merkezli radikal
■ $RO^{\bullet}$ - Alkoksil	Peroksitlerin parçalanması sırasında oluşur
■ $R^{\bullet}$ - Lipid radikali	Lipid molekülünden $H^{\bullet}$ ayrılması sonucu oluşur

Serbest radikallerin birçok hastalıklara neden oldukları bilinmektedir. Bunların başında ise günümüzün en ciddi hastalığı olan kanser gelmektedir. Serbest radikallerin neden olabileceği bazı hastalıklar Şekil 2.3’de verilmiştir.

2.3. Lipidlerin Oksidasyonu

Lipidlerin oksidasyonu çeşitli radikaller içeren karmaşık bir zincir reaksiyonudur. Oksitlenme süreci ışık, hava, sıcaklık, substratın fiziksel ve kimyasal özelliklerinden, oksitlenme katalizörlerinin ve uyarıcıların varlığından önemli derecede etkilenir.²⁰ Lipidlerin peroksidasyonu lipidli besinlerin ve yağların acılaşmasına, tat ve kalite bozukluklarına neden olan başlıca süreçtir.^{21,22}

Yağların oksidasyonu uyarılma, ilerleme ve sonlanmadan oluşan üç basamaklı bir zincir reaksiyonudur.



Şekil 2.3. Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar.

2.4. Antioksidanlar ve Sınıflandırılmaları

Antioksidanlar, lipid peroksidasyonun başlangıç ve/veya ilerleme basamağını önleyen ya da yavaşlatan maddelerdir. Antioksidanlar aynı zamanda hücrelerde oksitlenebilen maddelerin oksidasyonunu önleme veya yavaşlatma yeteneğine de sahiptirler.²³ Bu nedenle de antioksidanlara çeşitli alanlarda büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Antioksidanlar, kaynaklarına göre doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

2.4.1. Doğal Antioksidanlar

Doğal kaynaklı antioksidanlar meyvelerde, tahıllarda, baklagillerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bulunurlar.²⁴ Bunlarda yer alan antioksidanlar, fenolik maddeler, azotlu bileşikler (alkaloidler, klorofil türevleri, bazı aminler), polifonksiyonlu organik asitler ve karotenlerdir.²⁵⁻²⁷ Askorbik asit (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E) ve β -karoten geniş kullanımlı yaygın olan doğal antioksidanlardır.

2.4.2. Sentetik Antioksidanlar

Başlıca sentetik antioksidanlar substitue olmuş alkil gruplarına sahip fenolik yapıdaki maddelerdir. BHT, TBHQ, BHA ve PG sentetik antioksidanlardan bazılarıdır.

Ingold²⁸ tüm antioksidanları primer ve sekonder olmak üzere iki gruba ayırmıştır. Primer antioksidanlar oksidasyon zincirini sonlayan, sekonder veya önleyici (koruyucu) antioksidanlar ise çeşitli mekanizmalarla zincirin uyarılması sürecinin hızını yavaşlatan antioksidanlardır. Sekonder antioksidanlar, metal iyonlarının deaktivasyonunu, lipid peroksitlerinin istenmeyen uçucu ürünlere parçalanmasını önleme, primer antioksidanları rejenere etme, singlet oksijeni giderme vb. gibi etki mekanizmalarını içerir.²⁹

Bileşiğin primer antioksidan olarak etki gösterebilmesi için:

- Yapısındaki hidrojen atomunu lipid radikale çabuk vermesi.
- Oluşan radikalik türevin lipid radikale rağmen daha stabil olması.
- Lipid radikalini stabil ürüne dönüştürebilmesi gerekir.

Primer antioksidanlar genellikle fenolik bileşiklerdir.

2.5. Yapılan Çalışmalar

Górnaś ve ark.³⁰ çalışmalarında Letonyada bahar mevsimi sonunda toplanan erkek ve dişi H.R. bitkisinin farklı vejetatif parçalarından ekstratlar elde ederek (yaprak, sürgün, tomurcuk ve meyveleri) lipofilik antioksidan çalışmışlardır. Beş lipofilik bileşiğin üç tokoferol (α , β and γ) ile plastochromanol-8 ve β -karotenin erkek ve dişi bitkilerin kuru 100 g ağırlıklarındaki miktarları sırasıyla 7.25-35.41, 0.21-2.43, 0.41-1.51, 0.19-1.79 ve 4.43-24.57 mg olarak bulunmuştur. Buna ek olarak, α -Tokotrienol (1.99 mg / 100 g kuru ağırlık cinsinden) önemli miktarda bitkinin tomurcuk kısımlarında tespit edilmiştir.

Diandong ve ark.³¹ çalışmalarında H.R. bitkisinin Tibet ve Moğol geleneksel tedavi yöntemlerinde tıbbi bitki olarak kullanıldığını, yorgunluk önleyici hem de bağışıklık etkileri de dâhil olmak üzere çok yönlü tıbbi özellikleri olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarının sonuçları ratlara gavaj ile verilen H.R. yağının kronik stresli ratlarda nöroendokrin ve immüno sistemde etkili olduğunu göstermiştir.

H.R. nin önemli bileşenleri tespit edilmiştir. 40 Wistar sıçan 12 saat gün ışığında 12 saat karanlıkta olacak şekilde taze su ve yemle besleyerek 24°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Her grupta 10 sıçan olacak şekilde sıçanlar dört grup oluşturmuşlardır. Gruplar: A; kontrol grup B: stres grup C: stres + düşük doz (5 mL/kg) H.R. D: stres + yüksek doz (10 mL/kg). H.R. bitkisi linoleik asit, α -linolenik asit, palmitoleik asit, sitosterol ve β -karoten içermektedir.

Song ve ark.³² wistar cinsi sıçanları 5 gruba ayırarak (kontrol, yüksek lipid grubu ve 3 tane de H.R. düşük, orta ve yüksek dozlu grupları) H.R. ekstralarını oral olarak günde bir kez sıçanlara verdikten sonra sıçanların serumlarında lipid ve karaciğer doku patolojisini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, total kolesterol (TC), trigliserit (TG), düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-C) seviyelerinin yüksek yağlı grupta önemli derecede arttığını çalışmalarında gözlemlemişlerdir. H.R. meyvelerinin serum lipid düzeyini azaltabileceği ve karaciğer yağlanmasını engelleyeceği ayrıca hiperlipideminin önlenmesi için de kullanılabileceği kanısına varmışlardır.

Shivapriya ve ark.³³ yapılan çalışmada Hindistan'ın kuzey bölgesinde yetişen ve geleneksel farmakolojik aktivite gösteren H.R. bitkisinin antioksidan ve nöroprotektif aktivitelerini araştırmışlardır. H.R. hidroalkolik ekstraktının DPPH (% 0.0004), OH radikallerini giderme ve ferri-tiyosiyanat yöntemi kullanılmıştır. DPPH ve OH radikalleri için % 50 azalmaya neden olan derişim (IC₅₀) değerlerini ekstrakt için

sırasıyla 70.920 µg/mL and 0.463 mg/mL olarak bulmuşlardır. Ekstraktın aynı zamanda lipid peroksidasyonunu inhibe aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

Saeidi ve ark.³⁴ çalışmalarında H.R. bitkisinin kimyasal bileşenlerini araştırarak; Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile 100 g ekstrede askorbik asit ve β-karoten miktarlarını sırasıyla 170 mg 200 mg olarak tespit etmişlerdir. Toplam fenolik bileşik miktarlarını 247 mg gallik aside eş değer (GAE)/100 g şeklinde belirlemişlerdir.

Yogendra Kumar ve ark.³⁵ H.R. bitkisinin HPLC ile fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizini yapmışlardır. Analiz sonunda ekstrelerde rutin, quercetin, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucooside, myricetin, kaempferol, isorhamnetin bileşiklerini tespit etmişlerdir. Fenolik bileşik miktarları Folin–Ciocalteu yöntemiyle belirlemişlerdir ve sonuçları eşdeğer gram gallik asit olarak ifade etmişlerdir. Bitki yapraklarının ekstraktlarının fenolik yüksek fraksiyonlarındaki (PRF) gallik aside eşdeğer miktardaki fenolik bileşik miktarı 197.33-319.33 mg GAE/g ekstre arasında bulmuşlardır. En düşük su en yüksek ise etil asetat fraksiyonuna ait olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite DPPH (0.2 mM) kullanılarak Blois yöntemiyle tespit edilmiştir. % DPPH radikal giderme aktivitesi, 0.2 mg/mL derişim için PRF de % 79.56 bitki yaprak ekstresinde ise % 47.25 şeklindedir.

Kruczek ve ark.³⁶ dokuz farklı bölgede yetişen H.R. bitki türü ile çalışmışlardır. Ekstraksiyon işleminde her 5 g meyve için 20 mL n-heksan:etanol (1:1, h:h) çözücü karışımını kullanmışlar ve H.R. bitkisinin meyvelerinden elde edilen ekstraktların Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (FRAP) ve DPPH yöntemleriyle antioksidan aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Bulunan sonuçlara göre DPPH giderme aktivitesi % 31.82-45.78, FRAP değerleri ise 248-1892 µM arasındadır. Ayrıca HPLC analizi ile bitkilerde yüksek miktarda karetenoid tespit edilmiştir.

Varshneya ve ark.³⁷ çalışmalarında çekirdeksiz H.R. posasının üç farklı ekstraksiyonunu almışlardır; ME (metanol), AME (su:metanol 70:30) ve AE su ekstraktı. Toplam fenolik bileşik miktarı Folin Ciocalteu Reaktifi (FCR) kullanılarak GAE olarak ifade edilmiştir. Fenolik bileşik miktarı en fazla olan ekstrakt AME olmuştur, 84.28 ± 1.58 mg GAE/g ekstre. Bu değer su ekstraktına göre yaklaşık 4 kat daha fazladır. Ekstrelerin 200-2000 µg/mL derişim aralığında DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri DPPH'ın absorbans gösterdiği 517 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Tüm ekstreler farklı radikal giderme aktivitesi göstermişlerdir. IC₅₀ değerlerine bakıldığında DPPH, superoksit ve nitrik oksit radikalleri için AME'nin en yüksek aktiviteye sahip olduğu, ME'nin ise en fazla OH[•] radikali giderme aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. En yüksek indirgeme kuvvetini ise AME'nin gösterdiği belirlenmiştir. AME, ME ve AE için DPPH (0.1mM) serbest radikal giderme IC₅₀ değerleri sırasıyla 143.33, 179.77 ve 586.24 µg/mL olarak bulunmuştur.

Maheshwari ve ark.³⁸ sıçanlarda CCl₄ (CCl₄:Zeytinyağı (1:1) 2 g/kg rat) ile oluşturulan oksidatif zararlarda H.R. bitkisinin fenolik fraksiyonlarının antioksidan ve hepatoprotektif etkilerini araştırmışlardır. Toplam fenolik bileşik miktarı 319.33 mg GAE/g PRF olarak tespit edilmiştir. Ayrıca ters faz HPLC ile fenolik bileşikler olan gallik asit, myricetin, quercetin, kaempferol ve isorhamnetin derişimlerinin 1.935-196.89 mg/g PRF aralığında bulunduğu tespit edilmiştir. CCl₄ ile toksisite edilen ve aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), γ-glutamyl transpeptidaz (GGT) ve bilirubin değerleri yükselen ratlara oral olarak 25-75 mg/kg olacak şekilde verilmiş ve bu etkilerin azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler PRF nin karaciğerde CCl₄ ile meydana gelen zarara karşı koruyucu ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Hsu ve ark.³⁹ çalışmalarında CCl₄ ile toksisite edilen erkek sıçanlarda H.R. çekirdeklerinin yağlarının koruyucu etkisini araştırmışlardır. 8 hafta boyunca sıçanlara 0.16-1.30 ve 2.60 mg/kg oranlarında H.R. ekstresi verilmiştir. CCl₄ ise 1mL/kg olacak şekilde verilmiştir. Çalışmada CCl₄ tarafından karaciğerde oluşturulan zarara karşı H.R. çekirdek yağının optimum dozunun 0.26 mg/kg olduğu bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar H.R. çekirdeği yağının hepatoprotektif etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Chauhan ve ark.⁴⁰ H.R. bitkisinin antioksidan ve anti bakteriyel aktivitelerini incelemişlerdir. DPPH giderme aktivitesi için ekstrakt di-metil sulfoksit içerisinde çözünmüştür. Bu değer 0.48 µg/mL ekstrakt için % 0.68, 4.8 µg/mL ekstrakt için % 3.35 olduğu belirlenmiştir.

Sakar ve Friedrich⁴¹ yaptıkları çalışmalarda J.D. bitki yapraklarında amentoflavon, cupressoflavone, hinokiflavone, quersitrin and umbelliferone bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Taviano ve ark.⁴² çeşitli juniperus türlerinin deri hastalıkları ve enfeksiyonların tedavisinde kullanımını ve Türkiye'deki juniperus türlerinin metanol ve su ekstratlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Fenolik bileşik miktarları FCR ayırıcı kullanılarak GAE/g ekstre olarak ifade edilmiştir. DPPH (0.1 mM) serbest radikal gidermede, indirgeme kuvvetinde ve metal iyonu kelatlamada ekstratların 0.07-0.7 mg/mL derişim aralığında aktivitelerine bakılmıştır. DPPH giderme aktivitesinde IC₅₀ değerleri ise metanol ekstratlarında 0.046-0.164 mg/mL arasında, su ekstratlarında ise 0.034-0.898 mg/mL arasındadır. İndirgeme kuvvetinde sonuçlar eşdeğer askorbik asit/mL (ASE/mL) olarak ifade edilmiştir. Metanol ekstratlarında 1.781-3.564 ASE/mL arasında, su ekstratlarında ise 3.486-6.789 ASE/mL arasında olduğu tespit edilmiştir. Metal iyonu kelatlamada ise IC₅₀ değerleri, metanol ekstratları için 1.408-33.109 mg/mL, su ekstratlarında ise 0.537-3.530 mg/mL arasında olduğu belirlenmiştir. Fenolik

bileşik miktarları metanol ekstraktlarında 170.43 ile 253.29 mg GAE/g ekstrakt, su ekstraktlarında ise 98.74 ile 212.88 mg GAE/g ekstrakt değerleri arasında olduğu bulunmuştur. Metanol ekstrelerinde daha fazla fenolik bileşik olduğu, *Juniperus oxycedrus* L. macrocarpa Ball. türü en iyi DPPH aktivitesi gösterdiği (IC_{50}) = 0.034 ± 0.002 mg/mL), *Juniperus oxycedrus* L. subsp. oxycedrus türün en yüksek indirgeme kuvveti ve (1.78 ± 0.04 ASE/mL) metal iyonu kelatlama aktivitesi Fe^{2+} (IC_{50}) = 0.537 ± 0.006 mg/mL) gösterdiği, primer antioksidan aktivite ve fenolik bileşik miktarı arasında güçlü bir korelasyonun olduğu tespit edilmiştir.

Güvenç ve ark.⁴³ çalışmalarında beş juniperus türünde yağ asidi bileşenlerini tespit etmeye çalışmışlardır. Beş türün lipofilik ekstresinin yağ asidi metil esterlerini GC-MS ile tespit etmişlerdir. Juniperus türlerinin linoleik (% 25.8 - 32.5), linolenik (% 11.9 - 24.1) ve oleik asitleri (% 12.4 - 17.2) içerdiğini belirlemişlerdir.

Thomas ve ark.⁴⁴ H.R. bitkisinin yaprak, çekirdek, kök ve dal kısımlarının sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen hekzan, etil asetat ve su (su:etanol 90:10; h/h) ekstraktlarının ve basınçlı sıvı ekstraksiyon ile meyve kısımlarının 100 bar basınç ve 60 °C de elde edilen 40 °C de evaporatör ile kurutulan ve 2 °C de saklanan ekstraktlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. DPPH (0.075 mM) giderme metanolik DPPH'nin 75 µL'si ve 198 µL metanol ve 2 µL ekstre alınıp 30 dk bekletilerek 517 nm'de ölçüm alınmasıyla troloksa eşdeğer kuru ekstre miktarı olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar 174.8-528.6 troloks ekivalent/ekstre arasında değişmektedir. Kök ve çekirdek kısımları DPPH giderme aktiviteleri sırasıyla (500 ± 64 mg TE/g ekstre, 529 ± 79 mg TE/g ekstre) yaprak ve dallardan (175 ± 57 , 210 ± 42 mg TE/g) $p < 0.0001$) daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. İndirgeme kuvveti FRAP yöntemi ile tespit edilmiştir. Toplam fenolik bileşik miktarı FCR kullanılarak GAE/g ekstre olarak ifade edilmiştir. Ekstraktların fenolik bileşik miktarları 65 ± 14 ile 139 ± 22 mg GAE/g

ekstre değerleri arasında değişdiği, kök ve çekirdek ekstraktlarındaki fenolik bileşik miktarlarının yaprak ve dallardan daha yüksek olduğu, fenolik bileşik miktarı ve DPPH giderme aktivitesi arasında güçlü bir korelasyon olduğu ($P < 0.0001$ $r: 0.811$), çekirdek ve kök ekstraktlarının DPPH tutuklama aktivitelerinin yaprak kısımlarından daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Çekirdek ve kök kısımları bitkinin en antioksidan kısımları dalların ise en az antioksidan ve antimikrobiyal kısımlar olduğu gözlenmiştir. Tüm kısımların her iki aktivitesinin su ekstresinde yüksek olduğu ve bunun fenolik bileşik miktarı ile orantılı olduğunu vurgulamışlardır.

Thomas ve ark.⁴⁵ çalışmalarında basınçlı çözücü serbest mikro dalga ekstraksiyon tekniği iki seviyeli tam faktoriyel tasarım kullanılarak H.R. bitkisindeki antioksidanların ekstraksiyonu için geliştirilmiş ve kullanılmıştır. 1000 w dalga gücü, 5 kez tekrarlar ve 4 g bitkinin 50 mL'lik laboratuvar skale ekstraktrde en iyi ekstraksiyon durumu tespit edilmiştir. Bu ekstraksiyon yöntemi daha sonra diğer yaygın yöntemlerle karşılaştırılmış ve bu yöntemin diğer tekniklerle elde edilemeyen quersetin ve isorhamnetin gibi antioksidanları ekstrakte ettiği görülmüştür. DPPH (75 μ M) serbest radikali giderme ve FCR ile fenolik bileşik miktarı tayini yöntemlerini kullanmışlardır. DPPH serbest radikali gidermede 10 μ L rnek (1mg/mL) ve 1 mL DPPH zeltisi alınıp 15 dk sonra 517 nm'de ölçüm yapılmıştır. Değerler % 16.74-71.94 arasında ve fenolik bileşik miktarlarının ise 0.12-0.55 mg GAE arasında değiştiği belirlenmiştir.

Chih ve ark.⁴⁶ CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan farelerde in vitro ve in vivo şartlarda H.R. bitkisinin çekirdek kısımlarının DPPH serbest radikal giderme, metal iyonu kelatlama ve indirgeme kuvvetlerini araştırmışlardır. Sonuçlar artan derişimle tüm ölçümlerdeki aktivitelerin de arttığını göstermiştir. İn vivo çalışmalarda ekstrelerin CCl₄ ile oluşturulan oksidatif stresi azalttığı ve bitkinin doğal antioksidan kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir. DPPH serbest radikal gidermede 200 μ L DPPH (0.1 mM) ve

30 µL ekstre (0.92-18.3 mg/mL) ile gerçekleştirilmiştir. EC₅₀ değerleri kullanılmıştır (mg ekstre/mL). Serbest radikal giderme aktivitesi % 13-92 arasında değişiklik göstermiştir. EC₅₀ değeri ise 7.37 mg/mL'dir. Standart olarak troloks kullanılmış ve onun EC₅₀ değeri ise 0.92 mg/mL'dir. İndirgeme kuvveti çalışmalarında ise 0.42-8.32 mg/mL derişim aralığında 700 nm'de ölçüm yapılarak absorbens değerleri kaydedilmiştir. Absorbans değerleri 0.11-0.37 arasında değişmektedir. Troloxa ait indirgeme kuvveti ise ekstreden oldukça yüksek olup 0.82-1.69 arasında değişmektedir. Yaptıkları metal iyonu kelatlama çalışmalarında 0.92 - 18.3 mg/mL derişim aralığında aktivite değişimi % 7.74-38.5 arasında değişmiştir. Bu değerler 0.92 mg/mL'de % 90.4 aktivite gösteren etilendiamintetrasetik aside (EDTA) göre düşük 0.92 mg/mL derişimde % 6.55 aktivite gösteren Troloxa göre daha iyidir.

Yogendra ve ark.⁴⁷ yaptıkları çalışmada H.R. bitkisinin yapraklarının üç farklı ekstraksiyon yöntemi olan yumuşatma (su), soxhlet (% 70 etanol) ve subkritik su ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrelerinin toplam fenolik bileşik miktarlarını eşdeğer mg rutin/g ekstre olarak, indirgeme güçlerini 700 nm'de absorbens değerleri olarak ifade etmişlerdir. DPPH serbest radikal giderme ve FRAP yönteminde ise sonuçlar eşdeğer mg Trolox/g ekstre olarak ifade edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca HPLC ile ekstrelerdeki quersetin-3-galaktoside, kaempferol ve isorhamnetin belirlenmeye çalışılmış olup ters faz ve gradient elüsyon gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik bileşik miktarı 28.35-93.72 aralığında eşdeğer mg rutin/g ekstre olarak belirlenmiştir. DPPH (0.1 mM) serbest radikal gidermede ise 86.35-343.86 aralığında eşdeğer mg Trolox/g ekstre şeklindedir. İndirgeme kuvveti ise askorbik asit ile karşılaştırılmış olup değerler askorbik aside göre düşüktür. 0.1 mg/mL ekstre derişimi için yumuşatma (su), soxhlet (% 70 etanol) ve subkritik su ekstraktları değerleri sırasıyla 0.339, 0.376 ve 0.401 olduğu gözlenmiştir.

J.D. bitkisinin köklerindeki fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada Tarık ve ark.⁴⁸ dört farklı ekstrakt (su, metanol, hekzan ve diklor metan) elde etmişler ve toplam fenolik bileşik miktarı FCR yöntemiyle belirlemişler ve sonuçları mg GAE/g ekstre olarak ifade etmişlerdir. Fenolik bileşik miktarı ise hekzan, metanol ve su ekstraktlarında sırasıyla 3.2, 76.1 ve 25.4 mg GAE/g ekstre bulunmuştur. DPPH serbest radikal gidermede IC₅₀ değerleri kullanılmıştır. Metanol ve su ekstraktları için bu değerler sırasıyla 1.1 µg/mL ve 10.3 µg/mL'dir. İndirgeme kuvvetinde ise EC₅₀ değeri kullanılmıştır yani absorbansın 0.5 olduğu derişim değeridir. Bu değerler ise Metanol ve su ekstraktları için sırasıyla 72.0 ve 130.0 µg/mL'dir. Ayrıca bu çalışmada HPLC ile 17 farklı fenolik bileşik tespit edilmeye çalışılmıştır.

Taviano ve ark.⁴⁹ çalışmasında Türkiye'deki iki farklı bölgeden (İzmir, Çeşme, Çiftlikköy, Ankara, Kızılcahamam ve Işıkdagi) toplanan *Juniperus* türü bitkilerinin fenolik profilleri, antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. *Juniperus oxycedrus* (Joo) ve *Juniperus oxycedrus* L. macrocarpa (Jom) bitkilerinin metanol ekstraktlarını almışlardır. Fenolik bileşikleri mg GAE/g ekstre olarak ifade etmişlerdir. İndirgeme kuvveti, DPPH serbest radikal giderme ve metal iyonu kelatlama çalışmalarını da yapmışlardır. Serbest radikal giderme, indirgeme kuvveti ve metal iyonu kelatlama aktivite çalışmalarında ekstre derişimleri 0.07-1.4 mg/mL aralığındadır. DPPH serbest radikal gidermede sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak verilmiştir. Bu değerler *Jom* ve *Joo* için sırasıyla 0.63 mg/mL ve 1.84 mg/mL'dir. İndirgeme kuvveti ölçümünde 700 nm'de absorbans değerleri alınmış ve sonuçlar mg ASE/mL örnek olarak ifade edilmiştir. Bu değerlere bakıldığında *Joo* bitkisi *Jom* bitkisinden daha fazla indirgeme gücüne sahip ve absorbans değerlerinin 0.17-0.42 arasında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca mg ASE/mL örnek değerleri *Joo* ve *Jom* için sırasıyla ise 47.11 ve 4.05 olduğu belirlenmiştir. Metal iyonu kelatlama aktivitesi için IC₅₀ değerleri kullanılmış ve bu değerlerin *Joo* ve *Jom*

için sırasıyla 2.61 ve 4.16 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Standart olarak EDTA kullanılmış onun değerinin ise 0.0065 mg/mL olduğu bulunmuştur. Fenolik bileşikler ise *Joo* ve *Jom* için sırasıyla 5.14 ± 0.06 ve 17.89 ± 0.23 mg GAE/g ekstredir. Rutin, apigenin, biflavone gibi fenolik bileşikler HPLC ile tespit edilmiştir.

Marija ve ark.'nın⁵⁰ çalışmalarında *Juniperus Sibirica* Burgsdorf bitkisinin % 80 metanol ekstraktının DPPH serbest radikal giderme, FRAP yöntemi ile indirgeme kuvveti tayini ve ayrıca fenolik bileşiklerin analizini gerçekleştirmişlerdir. DPPH (0.09 mM) serbest radikal giderme değerleri IC₅₀ olarak verilmiş ve ekstre derişimleri bu ölçümler için 0.08-5.0 mg/mL aralığında alınmıştır. İğne ve meyve kısmı için sırasıyla IC₅₀ değerleri 6.20 ve 15.22 µg/mL olduğu, standart olarak ise BHT kullanıldığında onun IC₅₀ değerinin ise 8.28 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Fenolik miktarları ise FCR kullanılarak mg GAE olarak ifade edilmiş, iğne ve meyve kısmı için sırasıyla 163.66 ve 62.13 mg GAE/g ekstre olarak ve indirgeme kuvveti çalışmalarında ise iğne ve meyve kısmı için sırasıyla 114 ve 35 mg ASE/g ekstre olarak tespit edilmiştir.

Lucia ve ark.⁵¹ H.R. bitkisinin yapraklarının 50 g'nın etanol ekstraktlarını 500 mL % 70 etanolde elde etmişlerdir. Çalışmalarında DPPH serbest radikal giderme ve fenolik bileşik kalitatif analizi gerçekleştirmişlerdir. DPPH serbest radikal giderme sonuçları IC₅₀ değerleri olarak verilmiş standart olarak ise rutin ve gallik asit kullanılmıştır. Ekstrelerin 5-5000 µg GAE/mL derişimleri hazırlanmıştır. IC₅₀ değeri ise 3.0 µg/mL'dir bu değer standartlar Rutinin; 5.08 µg/mL ve gallik asitin 4.00 µg/mL olan IC₅₀ değerlerinden daha iyidir. H.R. yapraklarında fenolik bileşik olarak quercetin, apigenin, kaempferol, gallik asit ve ferulik asit türevleri tespit edilmiştir. HPLC ile yapılan retinol ve α-tokoferol çalışmalarında dokuda eş zamanlı analizlerine rastlanmamış ancak bitki örnekleri, serum ve plazmada tayinleri yapılmıştır.

Wisanu⁵² yaptığı çalışmada Tayland'da bulunan avokado bitkisinin su:hekzan (50:50, h/h) ekstraksiyonuyla elde edilen ekstrelerinde HPLC ile retinol ve α -tokoferolün eş zamanlı analizini gerçekleştirmiştir. Ayrıca birden fazla kolon kullanarak analizde kolonların etkisini de araştırmıştır. HPLC şartları: online degasser, UV-Görünür Bölge dedektör, RP- 18 kolon (25 × 4.6 mm), C₁₈ kolon (125 × 4.6 mm) ve C₁₈ kolon (100 × 4.6 mm), Gradient elüsyon, hareketli faz olarak metanol:su, akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 20 μ L'dir. Analitik yöntem validasyonu parametrelerinde ise retinol ve α -tokoferol için sırasıyla gözlenebilme sınırı (LOD) değerleri; 0.044 ve 0.134 μ g/mL, miktar tayin alt sınırı (LOQ) değerleri: 0.120 ve 0.364 μ g/mL'dir. Kesinlik değerleri 3 farklı derişim için (5-10-20 μ g/mL) bağıl standart sapma (RSD) hesaplanmıştır. Retinolün gün içi kesinlik değerleri sıyyla %1.61-1.90-1.04 ve günler arası: 1.02-1.00-1.01 olarak, α -tokoferolün gün içi kesinlik değerleri 1.07-1.47-1.80 ve günler arası: 1.05-1.21-1.33 olarak tespit edilmiştir. Doğruluk değerleri ise 4 farklı derişim için (5-10-20-30 μ g/mL) üç kez tekrarlanarak yapılmış ve % geri kazanım olarak ifade edilmiştir. Retinol için doğruluk değerleri %109.97-103.84-114.66-104.11 olarak, α -tokoferol için ise %106.16-102.51-106.07-97.27 olarak tespit edilmiştir. α -tokoferol 292 nm'de retinol ise 325 nm dalga boyunda maksimum absorbands verdiği tespit edilmiştir. Kullanılan kolonları karşılaştırdığında ise analiz süresi, hassasiyet ve piklerin kalitesi olarak en iyi Chromolith ® Flash RP- 18 kolon tespit edilmiş ve tüm analizlerin bu kolonla elde edildiğı belirtilmiştir.

William ve Emill⁵³ serumdan α -tokoferol ve retinolü UV ve amperometrik dedektörlü sıvı kromatografisi (LC) yöntemini kullanarak tespit etmişlerdir. İnternal standart (IS) olarak tokol, C₁₈ kolon, döteryum lamba, su/metanol/n-bütanol (15/75/10, h/h/h) hareketli faz kullanılmıştır. Gradient elüsyonda akış hızı ise 1.5 mL/dk ile başlayıp sonra 3.0 mL/dk ya çıkarılmış analiz sonuna doğru tekrar 1.5 mL/dk'ya

getirilmiştir. Ekstraksiyon prosesinde ise 250 µL seruma 25 µL tokolün etanolik çözeltisi ilave edilip vortekslenmiş, BHT'nin etanolik solüsyonundan (15 mg/mL) 250 µL ilave edilmiş ve 1 dk vortekslelendikten sonra üzerine 1.5 mL hekzan ilave edilmiş 2 dk 2000 g'de santrifüjlenip üst kısım alındıktan sonra kalıntıda aynı işlemler tekrarlanmış ve üst kısımlar birleştirilmiştir. Azot gazı altında kuruluğa kadar buharlaştırıldıktan sonra kalıntı 250 µL BHT çözücüsünde çözülmüş ve 25 µL sisteme enjekte edilmiştir. Retinol ve α-tokoferol için LOD değerleri 6 ve 96 µg/mL, LOQ değerleri ise 1.3 ve 16 µg/mL olarak belirlenmiştir. Analiz süresi hızlı izokratik elüsyonda 15 dk yavaş gradient elüsyonda ise 30 dk'dır. Çalışmada kesinlik ve doğruluk değerleri verilmemiştir.

Ganière-Monteil ve ark.⁵⁴ çalışmalarında retinol ve α-tokoferol'ün plazmadan analizini gerçekleştirmişlerdir. Dokudan hekzan kullanarak sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde ettikleri kalıntıyı eter:metanol (25:75, h/h) çözücü karışımında çözerek ters faz HPLC sisteminde analiz etmişlerdir. Asetonitril:metanol:su (64.5:33:2.5, h/h/h)'dan oluşan hareketli faz, 8 dk analiz süresi, 280 nm dalga boyunda UV dedektör çalışma şartlarını kullanmışlardır. Retinol ve α-tokoferol için LOD değerleri sırasıyla 0.015 mg/L ve 0.030 mg/L olarak belirlemişlerdir. Retinol ve α-tokoferol yetişkinlerin plazmasındaki derişimlerini sırasıyla 0.63 ve 9.61 mg/L, çocukların plazmasındaki derişimlerini ise sırasıyla 0.39 ve 7.10 mg/L olarak tespit etmişlerdir.

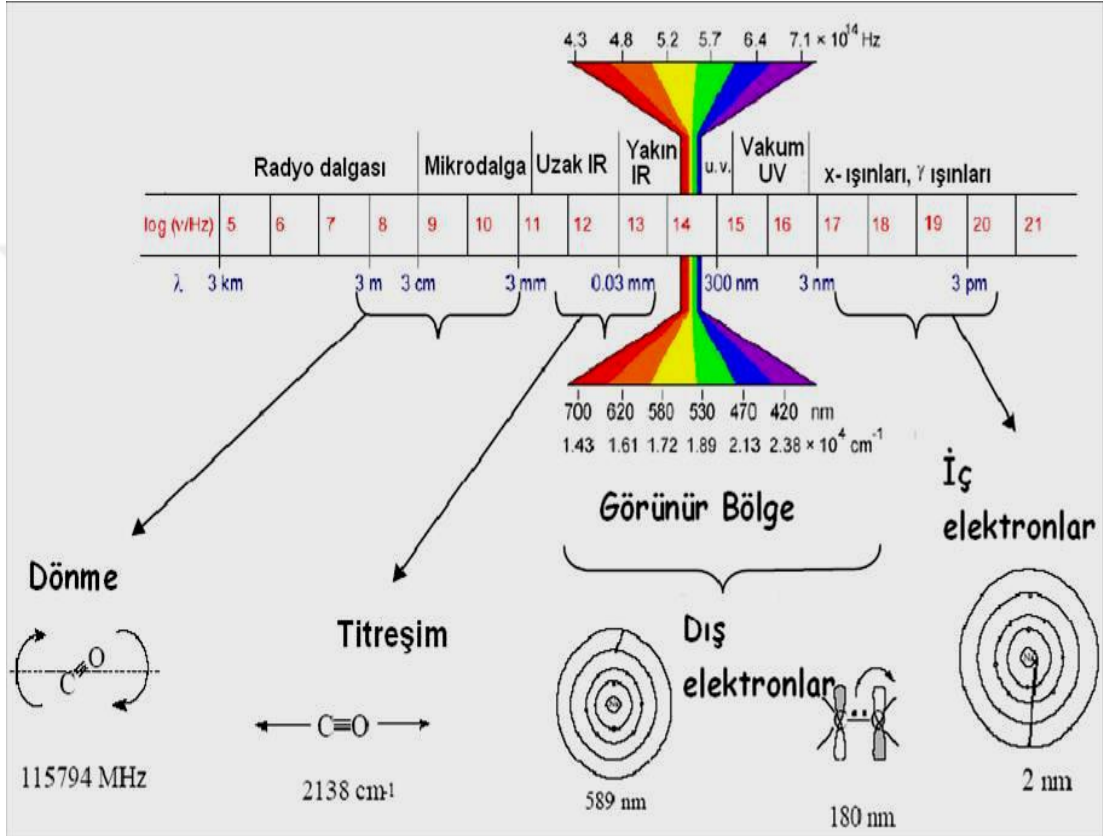
Thongchai ve Liawruangrath⁵⁵ çalışmalarında nano emülsiyon mısır özü yağında retinol ve α-tokoferol eş zamanlı analizini gerçekleştirmişlerdir. Hekzan ve petrol eteri ile mısır ekstraksiyonları yapılmıştır. Ekstraktlar DMSO içerisinde çözünerek HPLC sistemine verilmiştir. HPLC şartları: C₈ kolon, metanol/su hareketli fazı ve gradient elüsyon kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. α-Tokoferol ve retinol sırasıyla 290 ve 325 nm dalga boyunda tespit etmişlerdir. Her iki bileşik 5-40

$\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında, LOD değerleri sırasıyla 0.063 ve 0.067 $\mu\text{g/mL}$, LOQ değerleri ise 0.192 ve 0.203 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Analiz süresi 15 dk olarak verilmektedir. Yöntem validasyonunda kesinlik değerleri 3 farklı derişim için (5-10-20 $\mu\text{g/mL}$) % RSD olarak hesaplanmıştır. Retinolün gün içi kesinlik değerleri %2.34-1.81-1.48 ve günler arası %2.02-1.00-1.01, α -tokoferol'ün gün içi kesinlik değerleri ise %2.16-1.36-1.94 ve günler arası %2.05-1.21-1.33 olarak belirlenmiştir. Doğruluk değerleri ise 4 farklı derişim için (5-10-20-30 $\mu\text{g/mL}$) üç kez tekrarlanarak yapılmıştır ve % geri kazanım olarak ifade edilmiştir. Retinol için doğruluk değerleri %109.97-109.69-110.73-114.3 ve α -tokoferol için ise %106.16-88.22-99.16-100.45 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada mısırozü yağında sırasıyla 0.28 ve 12.80 $\mu\text{g/g}$ ekstre retinol ve α -tokoferol tespit edilmiştir.

2.6. Spektroskopik Yöntemler

Elektromagnetik ışının madde ile etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Spektroskopik yöntemler; atomik ve moleküler spektroskopi olmak üzere iki gruba ayrılır. İnorganik veya organik bileşiklerin kalitatif-kantitatif analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin ve molekül yapılarının aydınlatılmasında spektroskopik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Önceleri yalnızca elektromanyetik ışına ile madde arasındaki etkileşimler incelenmekteydi. Bugün için ise spektroskopinin içeriği diğer enerji türleri ve maddeler arasındaki etkileşimleri de kapsar şekilde genişlemiştir. Elektromanyetik ışına ise uzayda çok büyük bir hızla hareket eden dalga ve parçacık yapısında bulunan, pek çok yapıya girebilen bir enerji şeklidir. Elektromanyetik ışının madde tarafından soğurulması veya yayılması incelendiğinde, yayılma (emisyon) veya soğurma (absorpsiyon) spektroskopileri diye isimlendirilir. Spektroskopik yöntemlerde madde üzerine 110 - 30000 nm dalga boyu aralığında ışınlar gönderilir (Şekil 2.4). 110-1000 nm dalga boyu aralığındaki ışınlarla

çalışan cihazlara ultraviyole veya görünür (visible) alan, 1000-30000 nm dalga boyu aralığında çalışan cihazlara infrared, dalga boyu aralığı yüzlerce metreyi bulan radyo dalgaları ile çalışan cihazlara ise nükleer manyetik rezonans cihazları denir. Alan spektroskopilerine ise sırasıyla Görünür Bölge-Ultraviyole (Visible-UV), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopi adı verilir.^{56,57}



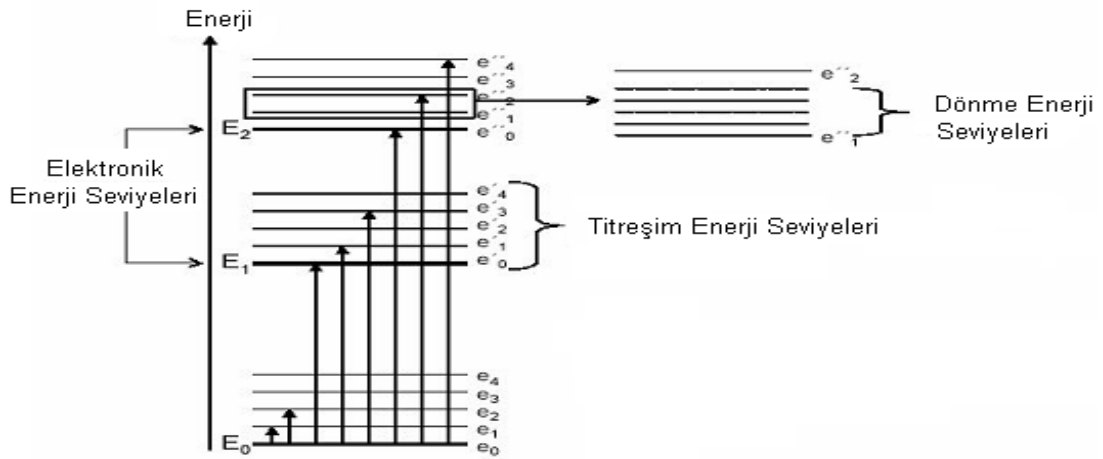
Şekil 2.4. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması⁵⁸

2.6.1. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi

Atomların dış katman elektronlarının uyarılması esasına dayanan spektroskopi atomik absorpsiyon spektroskopisi adını alır. Atomlarda, en dış katman elektronları ultraviyole ve görünür bölge ışınlarla uyarılmalarına rağmen, iç katman elektronları uyarılamaz. İç tabaka elektronlarını uyarabilmek için X-ışınları kullanılır. X-ışınları görünür bölge ışınlarından daha fazla enerjilidirler, en iç katman elektronlarının uyarılması ilkesine dayanan spektroskopi dalına ise X-ışınları spektroskopisidir.⁵⁶

2.6.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Moleküler Absorbans, UV ve görünür ışınları, düşük enerjili atomik ve moleküler orbitallerdeki elektronlarını, daha yüksek enerjili orbitallere çıkarılması sonucunda gerçekleşir. Moleküller, UV, görünür ve infrared ışınları ile uyarıldıkları zaman, kuantlaşmış 3 tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir (Şekil 2.5). Bir molekülün toplam enerjisi elektronik geçiş, titreşim ve dönme enerjilerinin toplamına eşittir. Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerdeki elektronlarla ilgili olan enerjidir. Titreşim enerjisi ise atomlar arası titreşimlere dayalı enerjidir. Dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesiyle oluşan enerjidir.^{56,59}



Şekil 2.5. Bir molekülde elektronik geçiş, titreşim ve dönme enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı⁵⁶

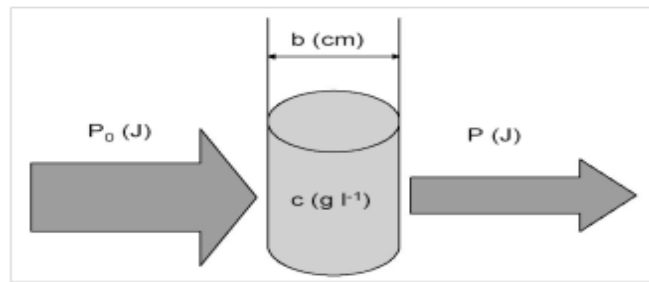
Elektronik geçişler 200-1000 nm dalga boyları arasındaki ultraviyole ve görünür alan ışınları ile gerçekleşir. Moleküler absorpsiyon spektroskopisinin, atomik absorpsiyon spektroskopisinden ayrılan en önemli yanı; atomik absorpsiyon spektroskopisinde birbirinden farklı dalga boylarında keskin çizgiler meydana gelmesine karşılık, moleküler absorpsiyon spektroskopisinde, fazla sayıda dalga boylarını içine alan geniş absorpsiyon bantlarının oluşmasıdır. Bir molekülde UV-

Görünür alan spektrumu, bağ elektronlarından birisinin bir fotonun enerjisini alarak üst enerji seviyesine geçmesiyle açıklanabilir.

2.6.3. Işının Absorplanması ve Lambert-Beer Yasası

Çeşitli dalga boyları bulunduran bir ışın demeti, saydam bir ortamdan geçirilirse, içerdiği bazı dalga boylarının olmadığı farkedilir. Bu olaya absorplanma denir. Işının enerjisi maddeye absorpsiyonla aktarılmış olur. Bu şekilde ışının enerjisini alan madde uyarılmış hale geçer.

Atom veya moleküler uyarıldığı halde 10^{-8} saniye kalabilirler. Sonra aldığı enerjiyi geri vermek suretiyle temel haline dönerler. Maddenin absorpladığı enerjinin geri verilme şekli ısıdır. Bu esnada madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışın enerjisi daha büyük dalga boylu ışınlar şeklinde yayılır. Bu olay fotolüminesans olarak bilinir. Bu olay kısa süreli ise floresans, daha uzun süreli ise fosforesans denir. Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, diğer maddelerden farklı olduğundan, her maddenin farklı bir absorpsiyon spektrumu oluşur. Absorpsiyon spektrumları; atomik absorpsiyon spektrumları ve moleküler absorpsiyon spektrumları olmak üzere iki kısma ayrılır.⁵⁹



Şekil 2.6. Absorblayan bir çözeltiye giren ışının P_0 şiddetinde girişi ve P şiddetinde çıkışı.⁵⁶

Maddenin absorplama derecesini ölçerek derişimini belirlemek için, absorpsiyon ile derişim arasındaki ilişki bilinmelidir. Monokromatik (tek dalgaboylu ışın) ve P_0 şiddetli bir ışın demeti, kalınlığı b cm olan bir küvetteki çözeltide bulunan herhangi bir

molekül tarafından absorplandığında şiddeti azalır ve P şiddeti ile çözeltiyi terkeder (Şekil 2.6). Buna göre ışın demetinin ortamdan geçme oranına geçirgenlik (T) adı verilir.^{45,73,75} $T = P / P_o$ şeklinde gösterilir. Geçirgenliğin eksi logaritması absorbans (A) olarak adlandırılır ve absorbans, $A = -\log_{10}T = -\log P / P_o$ şeklinde gösterilir. Moleküllerin seçilen dalga boyundaki ışımayı absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Lambert-Beer eşitliği olan $A = \epsilon.b.C$ bağıntısı ile verilir.^{56,57,59}

A: Absorbans , ϵ : Molar absorpsiyon katsayısı(mol/L.cm), C: Derişim (mol/L)

2.7. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, sabit bir faz üzerinden hareketli bir faz yardımıyla geçirilmesi esnasında farklı yürüme hızlarından yararlanarak bir karışımda ki birbirine yakın özellik gösteren bileşenlerin ayrılmasında, tanınmasında ve tayininde yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemler topluluğudur.^{56,57,59-62} Diğer ayırma yöntemlerinden hiçbirisi kromatografik yöntemler kadar etkili olmayıp uygulamada yaygın bir şekilde kullanılmazlar. Bu nedenle de kromatografik yöntemler özellikle araştırma amaçlı olarak çok geniş bir çalışma alanına sahiptir.

Tüm kromatografik ayırımlarda; numune sabit faz üzerinden gaz, sıvı ya da süperkritik bir akışkan olan hareketli faz yardımı taşınırlar. Taşınma esnasında maddelerin farklı yürüme hızlarına göre ayırma işlemi gerçekleşir. Kromatografik ayırmada seçilen sabit faz ile taşıyıcı fazın birbiri ile karışmaması için polarlıkları birbirinden farklı olması gerekmektedir. Eldeki bilgilere dayanarak kromatografinin genel bir tanımını yapmaya çalışırsak; bir karışımdaki bileşenler sabit bir faz üzerinden belirli bir hareketli faz yardımıyla taşınırken dağılma, yüzey adsorpsiyonu, boyut eleme ve iyon değiştirme gibi temel ayırma prensiplerinden yararlanarak birbirlerinden ayrılıp tanınması ve tayinini sağlayan yönteme kromatografi denir.

2.7.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kromatografi sabit faz, hareketli faz ve ayırma şekillerine göre değişik şekillerde sınıflandırılırlar.^{56,62} Bunlar:

1. Teorik Sınıflandırma

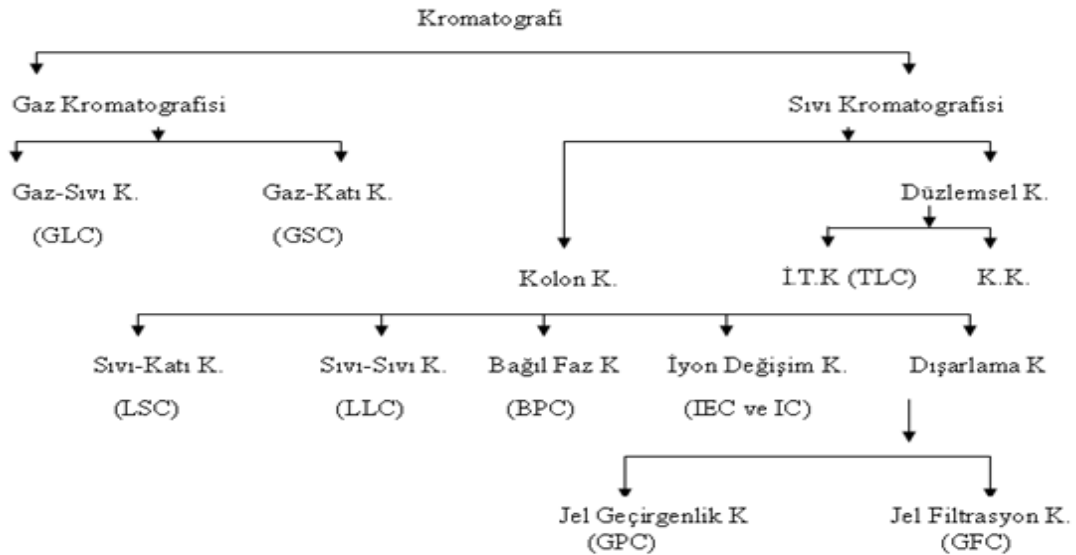
- a- Dağılıma Kromatografisi
- b- Adsorpsiyon Kromatografisi
- c- Boyut Eleme Kromatografisi
- d- İyon Değişim Kromatografisi
- e- Afinite Kromatografisi

2. Pratik Sınıflandırma

- a- Düzlemsel Kromatografi (Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografisi)
- b- Kolon Kromatografisi (Gaz, Sıvı ve Süperkritik Akışkan Sıvı Kromatografisi)

3. Hareketli ve Sabit Fazlara Göre Sınıflandırma

Kromatografinin fazlara göre sınıflandırması Şekil 2.7’de gösterilmektedir.



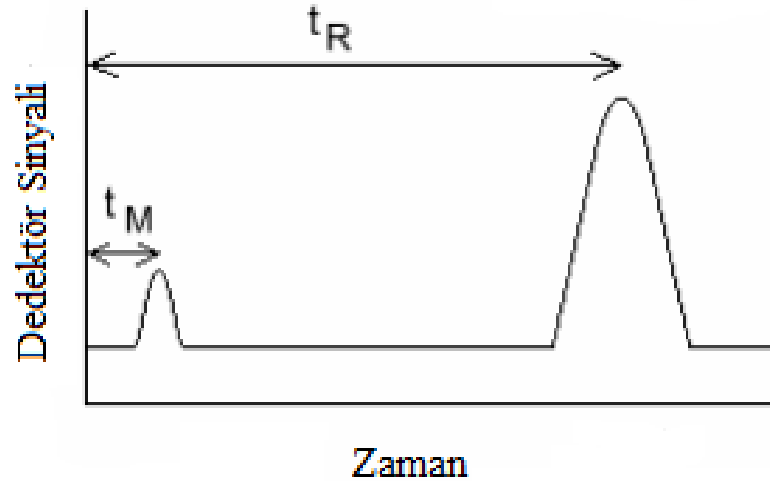
Şekil 2.7. Kromatografinin hareketli ve sabit faza göre sınıflandırılması⁵⁶

2.7.2. Kromatografinin Dayandığı Temel Olaylar

Kromatografide bulunan denge, bir analitin hareketli ve sabit faz arasındaki transferini kapsayan aşağıdaki basit eşitlikle tanımlanır.

$$A_{\text{hareketli}} \leftrightarrow A_{\text{sabit}} \quad K = C_{\text{sabit}}/C_{\text{hareketli}}$$

Bu reaksiyon için denge sabiti K , partisyon oranı veya dağılım katsayısı olarak adlandırılıp analitin sabit faz içindeki molar derişiminin, hareketli faz içindeki molar derişimine oranıdır. Bir analit piki için, numunenin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için gereken zamana da alıkonma zamanı denir ve t_R ile gösterilir (Şekil 2.8). Genellikle numune veya hareketli faz tutunmayan bir pik içerir. Tutunmayan maddenin dedektöre ulaşması için geçen zamana ölü zaman denir ve t_m ile gösterilir. Analitin göç etme hızı: (kolon dolgu uzunluğu/ ölü zaman) olarak ifade edilir. Analitin kolon üzerindeki göç hızını tanımlamak için kapasite faktörü (k_A) kullanılır.



Şekil 2.8. Tek bir bileşik için tipik bir kromatogram⁵⁶

k_A : [(analitin alıkonma zamanı-ölü zaman)/ ölü zaman] eşitliği ile gösterilir.

İdeal bir ayırım için kapasite faktör değeri 1 ile 5 arasında olmalıdır.

Kromatografik yöntemlerde maddelerin ayrılmasında etkin olan dört ayrı mekanizma mevcuttur. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.^{56,57,60,62}

2.7.2.1. Dağılma Kromatografisi

Dört farklı sıvı kromatografisi içinde en yaygın kullanılan tekniktir. Dağılma çözünen maddenin hareketli faz ile katı faz üzerinde adsorplanmış sıvı fazdaki çözünürlüğüne veya hareketli faz gaz ise uçuculuğuna dayanan bir olaydır. Sıvı-sıvı ve bağlı-sıvı faz kromatografisi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. Bu teknikler arasındaki fark, destek katısına sabit fazın tutunma esasına dayanır. Sıvı-sıvı kromatografisinde, sıvı faz sabit bir dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı-sıvı faz kromatografisinde ise katı destek yüzeye bağlı organik sıvı türler kimyasal olarak tutturulmuştur. Dağılma kromatografisinde hareketli ve sabit fazların bağıl polarlıklarına bağlı olarak iki kısma ayrılmaktadır. Sabit faz oldukça polar ve hareketli fazda apolar ise buna normal-faz kromatografisi, sabit faz apolar (çoğu zaman bir hidrokarbon) hareketli faz ise nispeten polar (su, asetonitril, metanol) ise buna da ters-faz kromatografisi denir.^{56,57,62}

2.7.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bir karışımdaki maddelerin katı destek üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması prensibine göre birbirlerinden ayrıldıkları kromatografisi olarak adlandırılır ve ilk keşfedilen kromatografisi çeşididir. Çözücü ve katı sabit fazın polarlıkları bir kolon boyunca veya bir yüzey boyunca çözünen maddenin hareketinin hızını tayin eder.^{56,57,62}

2.7.2.3. İyon Değiştirme Kromatografisi

Katı bir maddede bulunan iyonları, temas halinde bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü diğer iyonlarla bir dengeye göre yer değiştirmesi esasına dayanan bir kromatografik yöntemdir. Organik iyon değiştiriciler (bunlara reçineler de denir) suda ve birçok organik çözücüde hiç çözünmeyen, yapılarında sayılamayacak kadar çok anyon ve katyon taşıyan büyük moleküllü maddelerdir. Bunlar hem anyon, hem katyon değiştirmede ve hatta selektif iyon değiştirmede kullanılır. İnorganik iyon

değiştiricilerde en çok bilineni zeolitlerdir. Bunlar genel olarak; $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12}$ formülündedir.

İyon değiştirme kromatografisi, ilaç, ilaç metabolitleri, gıda koruyucu maddeler, serumlar, vitaminler, gibi çok sayıda farklı sistemlere uygulanabilmektedir.^{56,57,62}

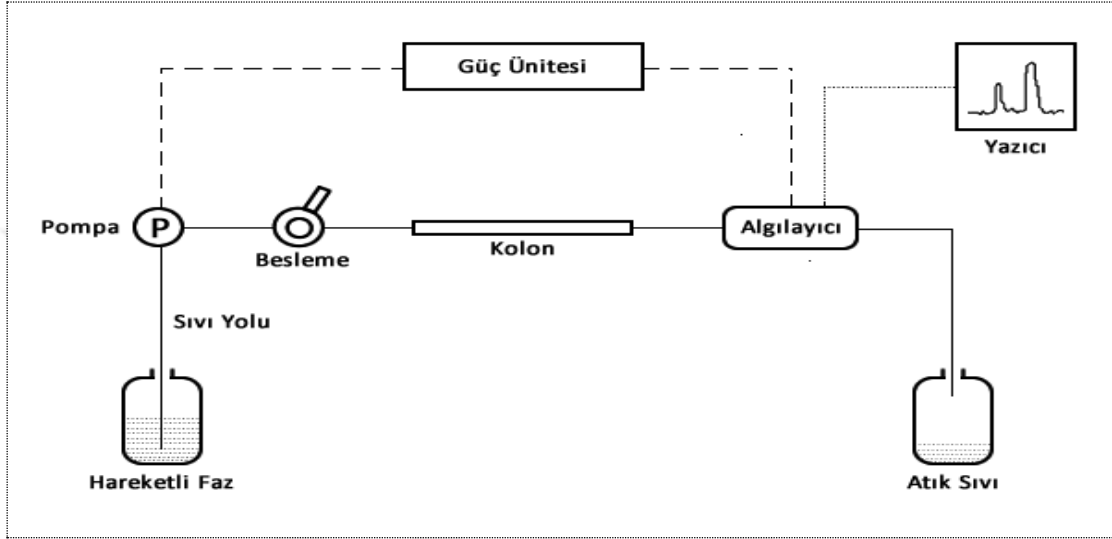
2.7.2.4. Boyut-Eleme Kromatografisi

Jel-geçirgenlik veya jel-süzme kromatografisi de denilen boyut-eleme kromatografisi, özellikle moleküllerin büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılmasında kullanılan önemli bir yöntemlerden biridir. Boyut-eleme kromatografisi için dolgu maddeleri, gözenek bulunduran küçük polimer taneciklerinden oluşmaktadır. Gözeneklerde küçük moleküller tutunurken, büyük moleküllerde gözenek dışında kaldığından dolayı hareketli faz akımı ile kolondan kolaylıkla elüe edilebilmekte ve daha sonrada gözeneklerde tutulan küçük moleküllerde hareketli faz akışı ile yüzeyden kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir.^{56,57,62}

2.8. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Küçük boyutlu dolgu maddeleri ile doldurulmuş bir kolondan yüksek basınç altında hareketli fazın geçirilmesi ile karışımındaki maddelerin birbirinden ayrılıp, tanınması ve tayinide kullanılan kromatografi tekniğine yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) denir. Hareketli faz sıvı olduğu için sıvı kromatografisi denilmektedir. İlk zamanlar hareketli fazın sabit fazı içeren bir kolondan belirli bir basınç uygulanarak geçirildiği içinde yüksek basınç kromatografisi denilmiştir. Günümüzde ayırma mekanizmalarında ve sistemde çok fazla ilerleme olduğundan yüksek performans sıvı kromatografisi olarak adlandırılmaktadır. Yüksek performans sıvı kromatografisi, dağılma kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi, iyon kromatografisi ve boyut-eleme (jel-filtrasyon ve jel-geçirgenlik) kromatografisi olmak üzere dörde ayrılır.⁵⁶ Yüksek performans sıvı kromatografisi bütün analitik ayırma

yöntemleri arasında en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bunun nedeni, bu yöntemin hassasiyetinin yüksek olması, sıcaklığa hassas olan maddelere bile uygulanabilmesi, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir. HPLC cihazı kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, örnek giriş sistemi (enjeksiyon bloğu), kolon, dedektör ve kaydedici (data sistemi) olmak üzere beş ana bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi

2.9. HPLC Uygulama Alanları

2.9.1. Kimyasal Ayırma

Belirli bir bileşiğin, durgun ve hareketli faz üstünde, ayırt edici bir hareket sabitesinin olduğu göz önünde bulundurularak yapılan ayırmadır. Kiral bazlı ayırımları yapmak mümkündür.

2.9.2. Saflaştırma

Hedef bir bileşiğin, diğer bileşiklerden veya safsızlıklardan ayrılmasıdır. Bu kromatografi yapılırken, yeterli ayırmanın sağlanabilmesi için, ne tür bir bileşiğin saflaştırılması gerektiği göz önünde tutularak, uygun hareketli faz ve durgun faz seçimi yapılmalıdır. İstenilen bileşiğin saf olarak ekstrakte edilebilmesi için, bileşiklerin ve kontaminantların, kolondaki göç hareketleri yeterli derecede farklı olmalıdır.

2.9.3. Kalitatif Analiz

HPLC ile herhangi bir bileşimin tanımlanması için, ilk önce uygun dedektör seçilmelidir. Bu dedektörler, kolondan ayrılan bileşikler ortaya çıkarmak amaçlı olarak, sabit fazın posterior kısmına yerleştirilirler. Bu amaç için geliştirilmiş birçok çeşit dedektör mevcuttur. Bu tip ayırma yapılırken en çok dikkat edilmesi gereken nokta, bilinen bir örneğin verdiği pikin kesin olarak saptanmış olmasıdır. Ancak yine de kesin bir sonuç elde etmek için birkaç yöntemin karşılaştırmalı olarak denenmesi gerekmektedir.

2.9.4. Kantitatif Analiz

HPLC ile miktar ölçümü, bilinmeyen bir derişimdeki bileşimin, bilinen bir çözelti içinde tanımlanması yöntemine dayanır ve bu tip bir ölçüm için bir seri derişimde standart çalışma çözeltisinin HPLC'ye enjekte edilip kromatogramları alındıktan sonra derişime karşılık cihaz cevabının grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisinin türetilmesi gerekir. Kalibrasyon eğrisi yardımıyla bilinmeyen bir numunedeki madde miktarı belirlenmektedir.

2.10. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

Antioksidanların etki mekanizmalarını açıklamak ve antioksidan aktivite kapasitelerini değerlendirmek için birçok yöntem mevcuttur. Antioksidanların aktivitelerinin belirlenmesinde çeşitli bulk lipid sistemleri veya bunların emülsiyonları, oksitlenebilen bileşikler içeren sistemler ve başka çeşitli substratlar uygulanmaktadır. Çoğunlukla araştırma süreçlerini basitleştirmek ve hızlandırmak amacı ile uygun model sistemler veya hızlandırılmış oksidasyon süreçleri kullanılır. Son yıllarda antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir.⁶³⁻⁶⁷

Çeşitli yöntemlerin uygulanması ve belirli zorunluluklara sahip substratlarla test yapılması antioksidanların aktivitelerinin karşılaştırılmasında bazı olumsuzluklara yol

açar. Bu nedenle de kompleks örneklerin düzenli incelenmesi için hızlı, basit ve güvenilir testler kullanılması gerekir.

Uygulanan farklı test yöntemlerinin sonuçları antioksidan aktivite (AOA) hakkında kısmi aynı zamanda sınırlı bilgiler verirler. Bu nedenle de bileşiklerin aktivitelerini ayrı ayrı yöntemlerle belirlemek ve uygulanan yöntemlerin sınırlamalarını değerlendirerek, yöntemlerin hangi ortamda daha iyi kullanılacağını açıklamak gerekir. Elde edilen deneysel bulgular, olumlu literatür bilgileri ile karşılaştırılarak yöntemin artı ve eksilerini göstermeli, aynı zamanda sonuç ve tavsiyeleri değerlendirmek için esas olarak kullanılmalıdır.⁶⁸

Antioksidan aktivite veya kapasiteyi bir mutlak değer olarak açıklamak zordur. Bu nedenle de, uygulanan yöntemden bağımsız olarak, incelenen substratların antioksidan aktivitelerini karşılaştırmak için uygun antioksidan standartlar kullanılmalıdır. Bu tür standartların seçilmesinde en iyi yaklaşım kimyasal özellikleri ve fiziko-kimyasal karakteristikleri incelenen örneklerle benzer maddelerin seçilmesidir. Bu amaçlarla sentetik antioksidanlar olan BHA, BHT ve doğal antioksidanlar α -tokoferol ve askorbik asit yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak tarafımızdan yapılmış literatür araştırması ve elde edilen değerlerin karşılaştırılması standart olarak kullanılan bu antioksidanlar için aynı koşullarda farklı değerlerin elde edildiğini göstermiştir.⁶⁹⁻⁷³ Bu tür uyumsuzluğu dikkate alarak yukarıda gösterilen antioksidanların radikal giderme ve başka özelliklerinin incelenmesinin de gerekli olduğu düşüncesiyle bu çalışmayı da gerçekleştirdik. Ekstrelerin antioksidan özelliklerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan yöntemler serbest radikal giderme, lipid peroksidasyonunu inhibe, metal iyonu kelatlama, ve indirgeme kuvveti tayini yöntemleridir.⁷³⁻⁷⁵

2.10.1. Serbest Radikal GidermeYöntemi

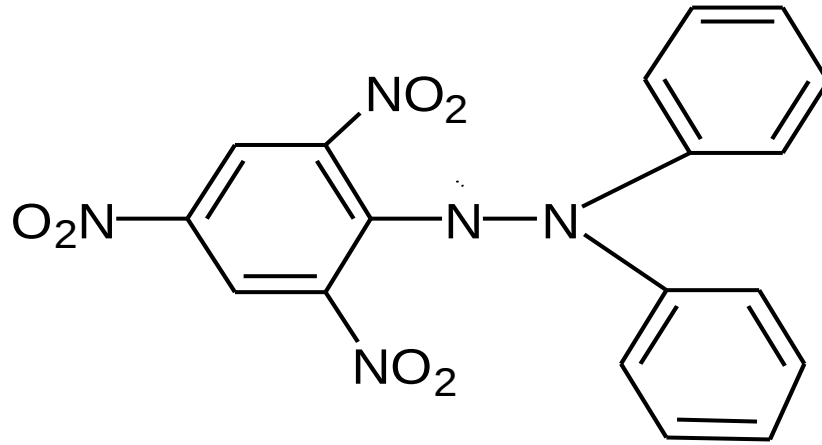
Bileşiklerin ve ekstrelerin serbest radikal giderme aktivitesi spektrofotometrik ve diğer yöntemlerle değerlendirilebilir.^{76,77} Spektrofotometrik yöntemler antioksidanların serbest radikal giderme kapasitelerini belirlemek için stabil radikaller veya tutuklayıcı ajanlardan faydalanan yaygın yöntemlerdir.^{78,79}

Lipid oksitleşmesinin ilerleme basamağını serbest radikaller geliştirirler ve aynı zamanda bu basamakta farklı aktiviteye sahip olan çeşitli radikaller ($LOO^{\bullet}$, $LO^{\bullet}$, $L^{\bullet}$ vb.) oluşur. Radikal giderme aktivitesini değerlendirilmesinde çoğunlukla kısmen dayanıklı olan DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{2+}$ gibi radikaller kullanılır.⁸⁰⁻⁸² Dayanıklı bir organik radikal olan DPPH $^{\bullet}$ radikali saf bileşiklerin, ekstrelerin ve besinlerin AOA değerlendirilmesinde geniş olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.10).^{7,81,83-85}

Bu yöntem DPPH'ın alkol çözeltisinde, hidrojen verebilen bileşiğin varlığında radikalın indirgenmesi sonucunda mordan sarıya olan renk değişiminin 517 nm'de ölçülmesine dayanır. DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorbans gösterir. Hatano ve ark.⁸⁶ tarafından tanımlanan bu yöntem bazı değişikliklerle kullanılmıştır. Bu reaksiyon sonucu DPPH göre non-radikale dönüşür. Belirli bir zaman aralığından sonra DPPH radikalının reaksiyon ortamındaki belirlenmiş olan miktarı antioksidanın radikal giderme aktivitesi ile ters orantılıdır. Bu yöntemin duyarlılığı DPPH'ın kuvvetli absorbsiyon özelliğinden kaynaklanır.⁸⁷

2.10.2. İndirgeme Kuvveti Tayini

İndirgeme kuvveti tayininde örneklerin elektron vermeleri sonucu indirgeme kuvvetleri spektrofotometrik olarak ölçülür. Bitki ekstrelerindeki redüktantlar $FeCN_6^{3-}$ kompleksinin Fe^{2+} ye indirgenmesine neden olur. Bu yüzden Fe^{2+} nin reaksiyon ortamındaki varlığı oluşan Perl's Prussion mavisinin 700 nm'de absorbansı ölçülerek gözlemlenebilir.⁸⁸



Şekil 2.10. DPPH'nin molekül yapısı.⁸⁷

700 nm dalga boyundaki absorbansın artışı Fe^{2+} miktarının, dolayısıyla indirgemenin arttığını gösterir. Ekstrelerin indirgeme özelliği genellikle redüktantların varlığından kaynaklanır. İndirgenlerin belli peroksitlerle reaksiyona girerek peroksit oluşumunu önledikleri bilinmektedir.⁸⁹

Tanaka ve ark.⁹⁰ antioksidatif etkinin üstel olarak indirgenme kuvvetinin fonksiyonu olarak arttığını göstermişlerdir. Bu ise antioksidan aktivite ile indirgeme kuvvetinin birlikte geliştiğini gösterir. Bu nedenle de ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin indirgeme kuvvetlerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

2.10.3. Metal İyonu Kelatlama Yöntemi

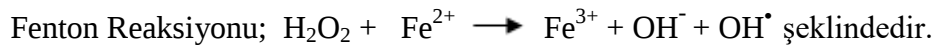
Geçiş metal iyonlarının (Fe^{2+} , Cu^{2+}), iz miktarlarında, lipidlerin serbest radikal mekanizmalı peroksidasyon sürecini katalizlediği bilinmektedir. Demir iyonlarının eser miktarlarının lipidlerin peroksitleşme sürecinde, zincirin ilerleme reaksiyonunu başlatan serbest radikallerin oluşmasına neden oldukları da açıklanmıştır.⁷⁵ Aynı zamanda geçiş metal iyonlarının peroksitleri peroksil ve alkoksil radikallerini parçalamakla da peroksitleşme sürecini hızlandırabilirler. Çünkü oluşan bu radikaller hidrojen alarak sürdürme yeteneğine sahiptirler.

Kelatlayıcı ajanlar ise geçiş metal iyonlarını kelatlayarak, bunların peroksitleşme sürecine sözü edilen etkilerini önleyebilirler. Diğer yönden, bitki ekstralarının lipid peroksidasyonunu önleme mekanizmasını daha iyi anlamak için bunların demir iyonlarını kelatlama etkilerini dikkate almak da çok önemlidir. Bu nedenle de bitki ekstralarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde demir iyonlarını kelatlama etkilerinin tayin edilmesi gerekir.

Ekstrelerde bulunan fenolik bileşikler ekstraların kelatlama aktivitesine ve serbest radikal giderme kapasitelerine, yani her iki etkiye de neden olabilirler. Ancak ekstralarda başka kimyasal bileşikler de bulunabilir ve ekstraların total antioksidan aktivitesine bunlar da katkıda bulunabilirler. Geçiş metallerinin az miktarı lipid peroksidasyonunda radikal zincir reaksiyonunun ilerlemesini başlatan serbest radikallerin oluşumunu katalizlediğinden kelatlayıcı ajanlar geçiş metallerini stabilize etmekle lipid peroksidasyonunu inhibe edebilirler.

Ekstraların lipid peroksidasyonunu inhibe etme mekanizmalarını daha iyi anlamak için bunların demir iyonlarını kelatlama aktivitesini belirlemek antioksidan aktivite yönünden büyük önem taşır. Bu aktivite değerlerinin önemli bir kelatlayıcı olan EDTA eşdeğeri olarak değerlendirilmesi de önemlidir.

Bir geçiş metali olan demir fenton reaksiyonu ile peroksitlerden serbest radikaller oluşturma yeteneğine sahiptir. Fenton reaksiyonundaki Fe^{2+} nin derişimindeki azalma oksidatif zararları da azaltır.⁸⁹ Metal iyonları kelatlama aktivitesi ile oksidasyon olayı arasında bir ilişki kurulabilir. Fe^{2+} ve ferrozinin oluşturduğu kompleks antioksidan varlığında daha az oluşur. Bu kompleks oluşumu antioksidan miktarıyla orantılıdır.⁷⁹ Demir iyonu Fenton Reaksiyonu ile lipid oksidasyonu teşvik eder.



2.10.4. Flavonoid Miktarı Tayini

Flavonoidler genellikle bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler oldukları ve hidroksil gruplarındaki protonu kolay verebildikleri için antioksidan özellikleri vardır. Bu yöntem flavonoidlerin miktarını standart madde kullanarak bu maddenin eşdeğer miktarı olarak verebilen bir yöntemdir. Referans standart olarak genellikle katekol kullanılır.

2.10.5. Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

Hidroksil gruplarından dolayı fenolik bileşiklerin proton verme yetenekleri vardır. Ayrıca polifenolik bileşikler insanda karsinogen ve mutagenleri azaltma etkisine sahiptir.⁷⁶ Fenolik bileşiklerin miktarını eşdeğer standart madde olarak belirleyen bir yöntemdir. Standart olarak genellikle galik asit kullanılır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Maddeler ve Aletler

3.1.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada kullanılan *Juniperus Drupacea* türü bitki Mersin yöresinden ve *Hippophae Rhamnoides* türü bitki meyvelenme döneminde Erzurum İli Tortum İlçesi yöresinden toplandı.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası
Etanol	Reidel-de Haën % 99.7
HCl	Reidel-de Haën % 37
Tween-20	Fluka
CCl ₄	Sigma Aldrich % 99.9
FeCl ₃ .6H ₂ O	Sigma % 98
Di Etil Eter	Sigma Aldrich % 99
B.H.A.	Sigma % 90 izomer-3, % 9 izomer-2
Fosfat Tampon Sistemi Tableti	Sigma
Folin &Ciocalteu’s Phenol Reagent (FCR)	Sigma 2 N
FeCl ₂ .4H ₂ O	Aldrich % 99
K ₃ Fe(CN ₆)	Aldrich % 99
NH ₄ SCN	Sigma % 99.7
Gallik Asit	Sigma
Na ₂ CO ₃	Sigma Aldrich % 99
L- Askorbik Asit	Aldrich % 99
BHT	Sigma % 99
EDTA	BDH Chemicals Ltd.
Ferrozin	Aldrich % 99
4-Dimethylamino-Cinnamaldehyde	Aldrich % 98
TCA	Sigma % 99
(±)-α-Tocoferol	Sigma % 95
DPPH	Fluka % 85
Metanol	Merck

3.1.3. Alet ve Cihazlar

Araştırmanın yürütülmesinde Tablo 3.2’de belirtilen alet ve cihazlar kullanıldı.

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihaz Adı	Markası
UV-Görünür Bölge Spektrofotometre	Thermo spectronic-HE λ OS β
Su Banyosu	Memmert
Santrifüj	Hettich-EBA 20
Hassas Terazî	Mettler Toledo
Vorteks	Isolab Laborgerat VM-20
Sokshlet Cihazı	İldam
Döner Buharlaştırıcı (Rotary Evaporatör)	Heidolph Laborota
Desikatör	İldam
Homojenizatör	Ka T 65 D Ultra-Turrax
Blender	Biohit
pH Metre	Mettler Toledo
Liyofilizatör	Labconco
Otomatik Pipetler	Eppendorf Research
Ultrasonik Banyo	Elma LC 30
Etüv	Memmert
Vakum Pompası	Phenomenex
HPLC Sistemi	Agilent Technologies 1200 Series
Degazer	Agilent Technologies
Pompa	Agilent Technologies
Kolon	C ₁₈ , 5 μ m, 250 x 4.6 mm, USA
Oto Örnekleiyici	Agilent Technologies
UV-Dedektör	Agilent 1200 series
Floresans Dedektör	Agilent 1200 series

3.2. Deneysel Çalışmalar ve Yöntemler

J.D. ve H.R. bitki yapraklarından ekstrelerin elde edilmesi için yapılan ekstraksiyon işlemleri ve ekstrelerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için yapılan analitik işlemler bu bölümde verildi.

3.2.1. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1.1. Radikal Giderme Aktivite Tayini İçin Çözeltilerin Hazırlanması

100µg/mL DPPH (1-1 difenil 2-pikril hidrazil) Çözeltisinin Hazırlanması

10 mg DPPH ilk önce bir miktar etanolde çözüldü ve daha sonra hacim etanol ile 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti ışık etkisinden korunması için etrafı alüminyum folyo ile sarıldı.

3.2.1.2. İndirgeme Kuvveti Tayini İçin Çözeltilerin Hazırlanması

0.2 M pH 6.6 Fosfat Tamponunun Hazırlanması

İki tablet PBS yaklaşık 180 mL saf suda çözüldü, pH metre yardımıyla çözeltinin pH'ı 6.6 olacak şekilde 0.1 M HCl ile ayarlandı ve hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

% 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ Çözeltisi Hazırlanması

1.5 gr $K_3Fe(CN)_6$ ilk önce bir miktar saf suda çözüldü ve hacim 150 mL'ye saf su ile tamamlandı.

% 10'luk Triklorasetik Asit (TCA) Çözeltisinin Hazırlanması

15 gr TCA ilk önce bir miktar saf suda çözüldü ve hacim 150 mL'ye saf suyla tamamlandı.

% 0.1'lik $FeCl_3$ Çözeltisinin Hazırlanması

83 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ilk önce bir miktar saf suda çözülmesi sağlandıktan sonra hacim 50 mL'ye saf suyla tamamlandı.

3.2.1.3. Metal İyonu Kelatlama Aktivite Tayini İçin Çözeltilerin Hazırlanması

2mM FeCl₂ Çözeltisinin Hazırlanması

3.9 mg FeCl₂.4H₂O alınıp 10 mL'lik balon jojeye konuldu bir miktar saf suda iyice çözülmesi sağlandıktan sonra hacmi saf suyla 10 mL'ye tamamlandı.

5mM Ferrozin Çözeltisinin Hazırlanması

10 mL'lik balon jojeye 24.6 mg ferrozin konulduktan sonra bir miktar saf suda çözünmesi sağlandı ve hacmi 10 mL'ye saf suyla tamamlandı.

3.2.1.4. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İçin Çözeltilerin Hazırlanması

% 2'lik Na₂CO₃ Çözeltisinin Hazırlanması

100 mL'lik balon jojeye 2 gr Na₂CO₃ konulduktan sonra bir miktar saf suda tam olarak çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye saf suyla tamamlandı.

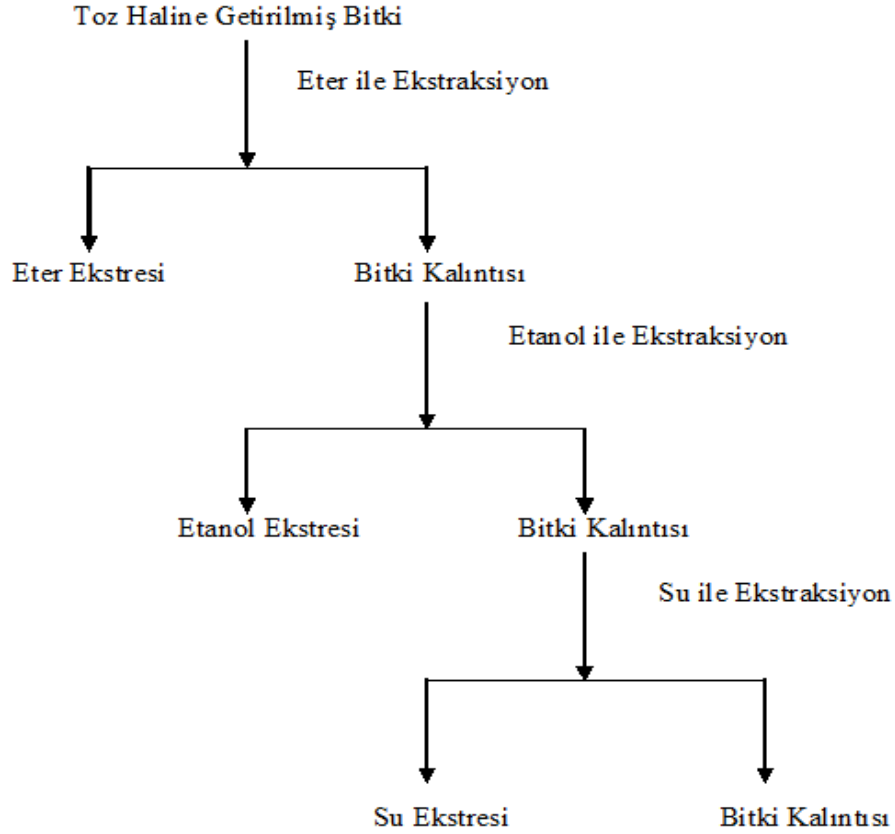
3.2.2. Bitki Ekstrelerinin ve Hayvan Gruplarının Hazırlanması

3.2.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

J.D. bitkileri Mersin yöresinden ve H.R. bitkileri Tortum-Erzurum yöresinden toplandı. Bitkilerin meyve kısımları oda ortamında kurutulduktan sonra blenderde öğütüldü. Daha sonra su ve etanole göre apolar bir çözücü olan eter ile ekstraksiyon için soxhlet düzeneği kuruldu ve su banyosunda renksizleşene kadar ekstraksiyona devam edildi. Eterle ekstraksiyondan geride kalan bitki kalıntısı etanol ile 37 °C'de 3 kez 9 saat çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyon yapıldı. Daha sonra etanol ekstraksiyonundan geride kalan bitki kalıntısı saf su ile 37 °C'de 3 kez 9 saat çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen eter ve etanol ekstreleri süzüldü ve koyulaşana kadar evaporatörde çözücüsü uçuruldu, azot atmosferinde kurutuldu ve kalan kısım vakumlu desikatörde muhafaza edildi. Su ekstreleri süzildükten sonra liyofilizatörde 5µm-Hg

basınç altında -50 °C’de kurutuldu ve buzdolabının derin dondurucu kısmında muhafaza edildi.

J.D. ve H.R. bitki yapraklarının ekstraksiyon şeması Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. J.D. ve H.R. bitkilerinin ekstraksiyon şeması

3.2.2.2. Hayvan Gruplarının Hazırlanması Doku ve Kan Örneklerinin

Alınması

Hayvan deneylerinin yapılabilmesi için Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının 06.11.2011 tarihli ve 74 sayılı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı alındı. Deney hayvanları albinostar cinsi ratlar olup hepsi dişi ve ortalama ağırlıkları ise 250 gr olacak şekilde Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden BAP Projesi kapsamında temin edildi. Karaciğer toksisitesi oluşturulacak hayvanlara CCl₄ intraperitoneal olarak 0.6 mL/kg denek olacak şekilde verildi. Bitki ekstreleri H.R. ve J.D. ise 500 µg/kg denek olacak şekilde oral olarak

verildi. 1. gün hayvanlara beslenme şekillerine göre bitki ekstraları ya da zeytinyağı verildi. 2. gün CCl₄ verilecek gruplara verilip 30 dk sonra yine beslenme şekillerine göre bitki ekstraları ya da zeytinyağı verildi. 3. gün ise karbon monoksit (CO) gazı altında anestezi ile eksitasyon yapıldı. Eksitasyon sonrası patolojik değerlendirme için doku örnekleri % 10 formalin içine alınarak Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarına verildi. Karaciğer dokuları alınarak -80 °C’de analize kadar muhafaza edildi. Ayrıca ALT, AST tayini için Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarına verilmek üzere kan örnekleri de alındı. Tablo 3.1’de deney hayvanlarının gruplandırılmaları verildi.

Tablo 3.3. Deney hayvanlarının gruplandırılması.

Grup Adı	Beslenme Şekli	CCl ₄ (0.6 mL/kg)	Ekstre (500 µg/kg)
Kontrol	Yem	-	-
Negatif Kontrol	Yem	+	-
J.D. Eter	Yem	-	+
J.D. Eter + CCl ₄	Yem	+	+
J.D. Etanol	Yem	-	+
J.D. Etanol + CCl ₄	Yem	+	+
J.D. Su	Yem	-	+
J.D. Su + CCl ₄	Yem	+	+
H.R. Eter	Yem	-	+
H.R. Eter + CCl ₄	Yem	+	+
H.R. Etanol	Yem	-	+
H.R. Etanol + CCl ₄	Yem	+	+
H.R. Su	Yem	-	+
H.R. Su + CCl ₄	Yem	+	+
Zeytinyağı	Yem	-	-

3.2.3. Spektrofotometrik Yöntem Çalışmaları

3.2.3.1. DPPH Radikal Giderme Tayini

H.R. ve J.D. bitki ekstraları, BHA, BHT, askorbik asit ve α -tokoferol'ün serbest radikal giderme aktiviteleri DPPH kullanılarak Shimada ve ark.'nın⁹¹ yöntemine göre yapıldı. DPPH'nin etanoldeki 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimde çözeltisi hazırlandı. Ekstreler elde edildikten sonra çözelti hazırlamada seyreltme işlemleri etanol ile yapıldı (100-1000 $\mu\text{g/mL}$). Yöntem çalışmasında 1 mL bitki ekstre çözeltisinden alınarak alüminyum folyo ile sarılı deney tüpüne koyulduktan sonra üzerine 3 mL DPPH çözeltisi eklendi ve 30 dakika karanlıkta bekletildi. Karışım vortekslenip etanole karşı 517 nm dalga boyunda absoransı okundu. Kontrol olarak antioksidan içermeyen çözelti kullanıldı. Daha düşük absorans ekstraların daha yüksek radikal giderme yeteneğini gösterir. % radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formülle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Radikal giderme: } [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

A_1 : Reaksiyon karışımının absorans değeri.

A_0 : Radikal çözeltisinin absorans değeri.

3.2.3.2. İndirgeme Kuvveti Tayini

Ekstrelerin indirgeme kuvvetinin tayini Oyaizu⁹² yöntemine göre yapıldı. 1mL örnek deney tüpüne alındı ve üzerine 2 mL fosfat tamponu (0.2 mM pH 6.6) ve 2 mL potasyum ferri siyanür [% 1 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] eklenip vortekslendi. Karışım 50 °C de 20 dk su banyosunda bekletildi. % 10'luk TCA'nın 2 mL'si ilave edilip 2500 rpm (devir/dakika)'de 10 dk santrifuj edildi. Santrifuj sonunda berrak kısımdan 2 mL alınıp üzerine 2 mL saf su ilave edildi. Karışıma 0.5 mL FeCl_3 (% 0.1) ilave edilip 10 dk sonra 700 nm'de absorans ölçüldü. Absoranstaki artış indirgeme kuvvetinin arttığını gösterir. Vitamin E ve vitamin A kontrol olarak kullanıldı.

3.2.3.3. Metal İyonları Kelatlama Aktivite Tayini

Ekstrelerin Fe^{2+} kelatlama aktivitesi Dinis ve ark.⁹³ yöntemine uygun olarak yapıldı. Ekstrelerin 10 mg/mL' lik stok çözeltisi etanolde hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden 1-10 mg/mL derişim aralığında çözeltiler hazırlandı. Her çözeltiden 1 mL alındı ve üzerine 3.7 mL etanol ilave edildi. Daha sonra sırasıyla 0.1 mL FeCl_2 (2mM) ve 0.2 mL 5mM ferrozin ilave edilip 10 dk sonra 562 nm'de her bir örneğin FeCl_2 ve ferrozin içermeyen körüne karşı absorbens ölçüldü. Referans olarak EDTA çözeltisi kullanıldı. % Metal iyonu kelatlama aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ Kelatlama: } (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$

A_1 : Örneğin absorbens değeri; A_0 : Kontrolün absorbens değeri

3.2.3.4. Toplam Fenolik Bileşiklerin Tayini

Ekstrelerde fenolik bileşiklerin miktar tayini FCR ile gerçekleştirildi.⁹⁴ 200 μL numune (ekstre) çözeltisi alındı ve hacim % 0.3'lük HCl ile 500 μL 'ye tamamlandı. Karışımdan 200 μL alındı 4 mL % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisine eklendi. 2 dk sonra 200 μL FCR ilave edilip 30 dk sonra 750 nm'de absorbens ölçüldü. Kör olarak % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi kullanıldı. Sonuçlar ekstre başına eşdeğer gallik asit miktarı olarak verildi.

3.2.4. Kromatografik Yöntem Çalışmaları

Karataş ve Kamışlı⁹⁵ yaptıkları çalışmada IR ve mikrodalgada kuruttukları kaysı numunelerinde malondialdehit, retinol ve α - tokoferolün miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada kaysı numunelerinde retinol ve α - tokoferolün HPLC ile analizi için bir ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Çalışmamızda karaciğer dokularında retinol ve α - tokoferolün ekstraksiyon işlemi için Karataş ve Kamışlı⁹⁵ tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanıldı. UV dedektörlü HPLC yöntemiyle retinol ve α - tokoferolün karaciğer dokularında miktar tayini için literatürde mevcut olan yöntemler modifiye edilerek kullanıldı. Ayrıca karaciğer dokusunda retinol

ve α -tokoferolün eş zamanlı miktar tayini için floresans dedektörlü HPLC yöntemi de geliştirilip valide edildi ve karaciğer toksisitesi oluşturulmuş ratların karaciğer dokularında miktar tayini gerçekleştirildi. HPLC çalışmasında, uygulanan yöntem şartları Tablo 3.4’de verildi.

α -Tokoferol ve Retinolün Dokudan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi

1. 0.1 g doku alınıp 1 mL saf su ile homojenize edildi.
2. Final derişimi 200 μ g/mL olacak şekilde α -tokoferol asetat (IS) eklendi.
3. Belirli derişimlerde retinol ve α -tokoferol eklendi.
4. 1 mL soğuk etanol eklendi ve vortekslendi.
5. 5 mL hekzan eklendi ve tüplerin ağzı kapatılarak 5 dk vortekslendi.
6. 4000 rpm de 10 dk santrifüjlendi.
7. Organik faz alındı, oda koşullarında azot gazı altında uçuruldu.

HPLC Analizi;

1. 1 mL etanolde çözüldü.
2. 30 saniye karıştırıldı.
3. 45 μ m gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü.
4. Otomatik pipetle viallere koyuldu.
5. 10 μ L HPLC sistemlerine enjekte edildi.

Tablo 3.4. HPLC yöntem şartları

Kolon	C ₁₈ (5 μ m, 150 x 4.6 mm)
Dedektör	UV ve Floresans
Dalga boyu	UV dedektör için 292 nm
Eksitasyon dalga boyu	λ Retinol:328 nm λ Toc:293 nm λ Toc Act:284 nm
Emisyon dalga boyu	λ Retinol:480 nm λ Toc:330 nm λ Toc Act:310 nm
Hareketli faz gradient	0-3 dk: Metanol/Asetonitril (80:20, h/h) 3-5,5 dk: Metanol/Asetonitril/Su (75:20:5, h/h/h)
Kolon akış hızı	1mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 μ L

4. BULGULAR

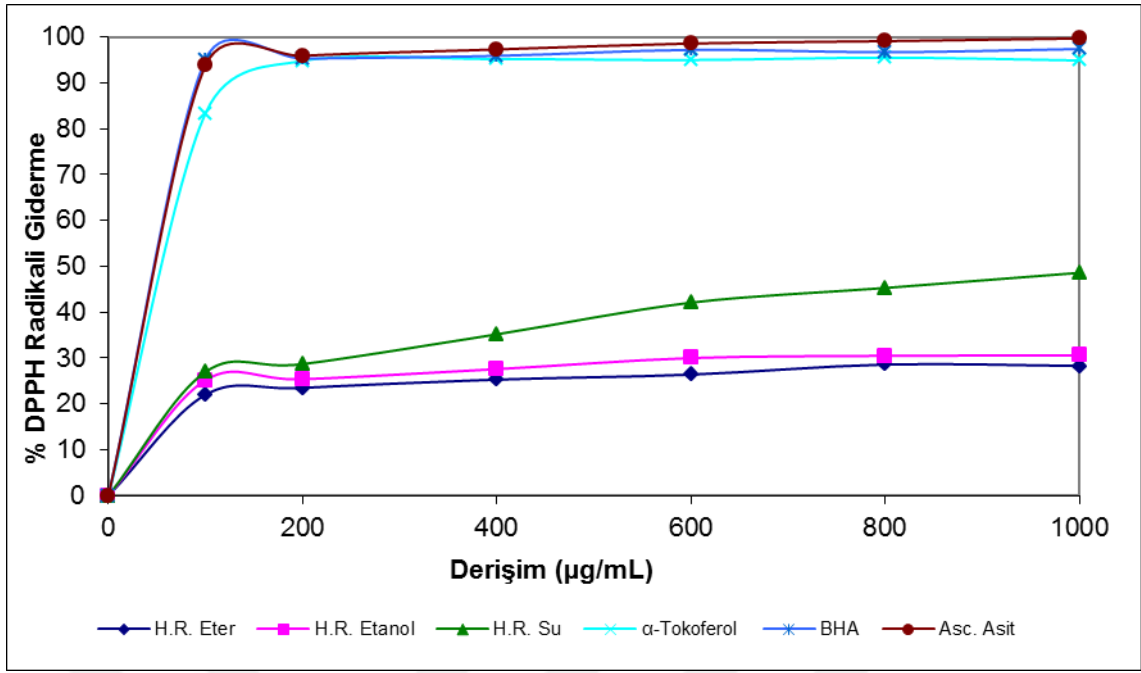
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

4.1.1. Radikal Giderme

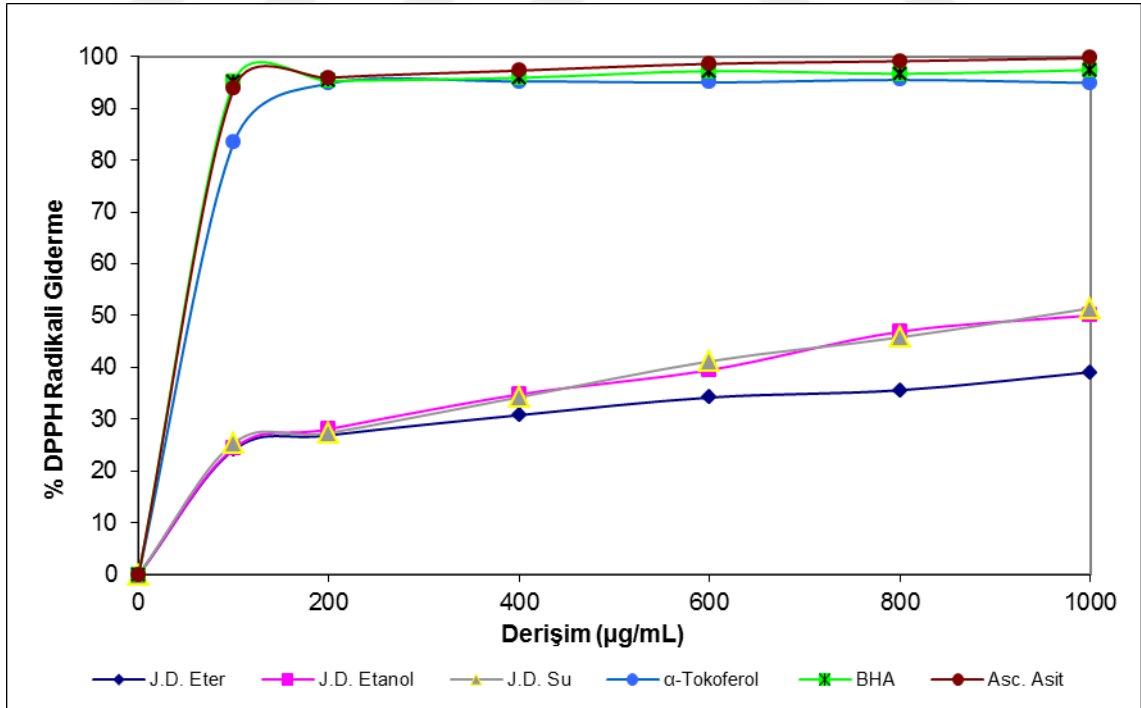
J.D. ve H.R. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstraktlarının serbest radikal giderme aktivite ölçümleri Shimada ve ark.'nın⁹¹ yöntemine göre yapıldı. Ekstreler 100-1000 µg/mL derişim aralığında kullanıldı. Sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.1 - 4.3'te verildi. En yüksek aktiviteyi J.D. bitkisi su ekstresi gösterdi (% 51.42).

Tablo 4.1. H.R. ve J.D. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstraktları ile standartların (α-tokoferol, BHA, askorbik asit) 100 µg /mL DPPH giderme aktivitesi (n=6)

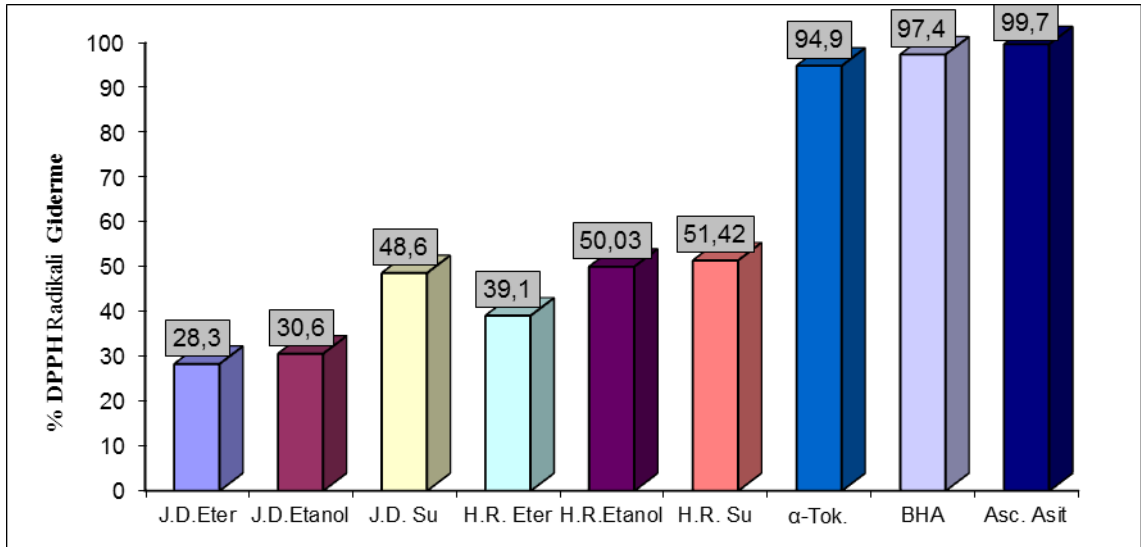
% DPPH Radikal Giderme									
Derişim (µg/mL)	H.R.			J.D.			Standartlar		
	Eter	Etanol	Su	Eter	Etanol	Su	α-tokoferol	BHA	Askorbik asit
100	22.0	25.2	27	24.1	24.4	25.4	83.4	95.1	93.8
200	23.5	25.4	28.7	26.9	28.1	27.4	94.8	95.3	95.9
400	25.3	27.6	35.2	30.8	34.8	34.3	95.2	95.9	97.3
600	26.4	30.0	42.1	34.2	39.5	41.2	95.0	97.2	98.6
800	28.6	30.5	45.3	35.6	46.9	45.8	95.5	96.7	99.1
1000	28.3	30.6	48.6	39.1	50.0	51.4	94.9	97.4	99.7



Şekil 4.1. H.R. bitkisinin eter, etanol ve su ekstraktları ile standartların (α -tokoferol, BHA, askorbik asit) 100 μ g/mL DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri



Şekil 4.2. J.D. bitkisinin eter, etanol ve su ekstraktları ile standartların (α -tokoferol, BHA, askorbik asit) 100 μ g/mL derişimdeki DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri



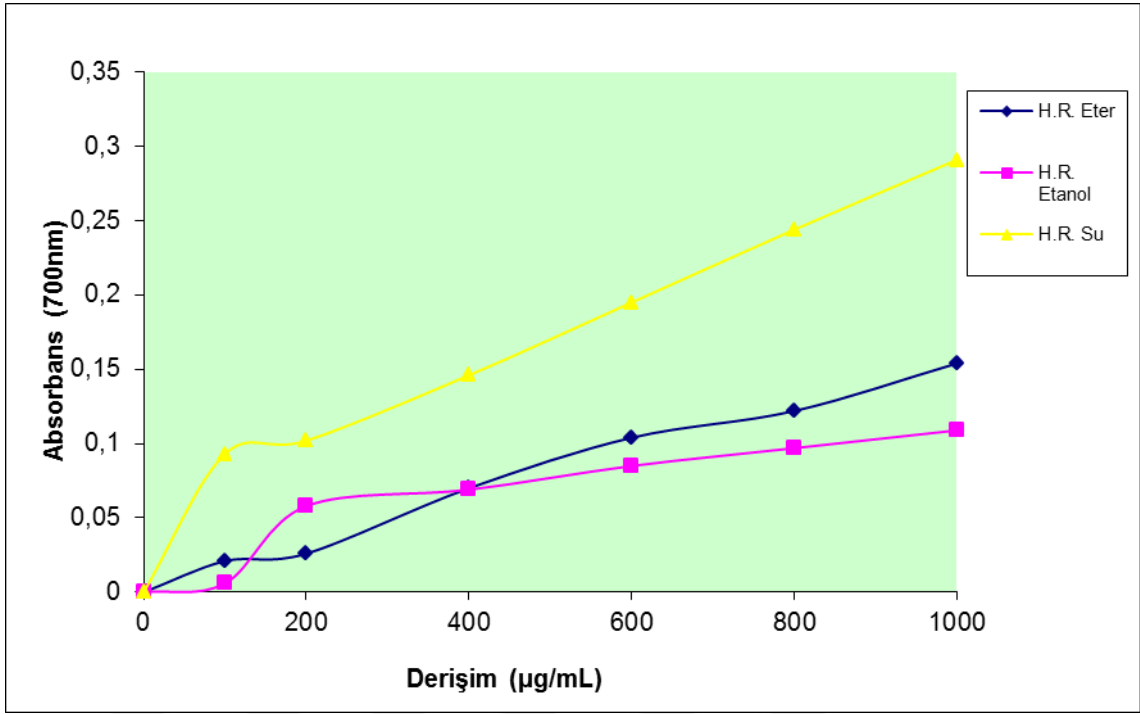
Şekil 4.3. Askorbik asit, BHA ve α -tokoferol ile H.R. ve J.D. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstralarının (1000 $\mu\text{g/mL}$) serbest radikal giderme aktiviteleri

4.1.2. İndirgeme Kuvveti

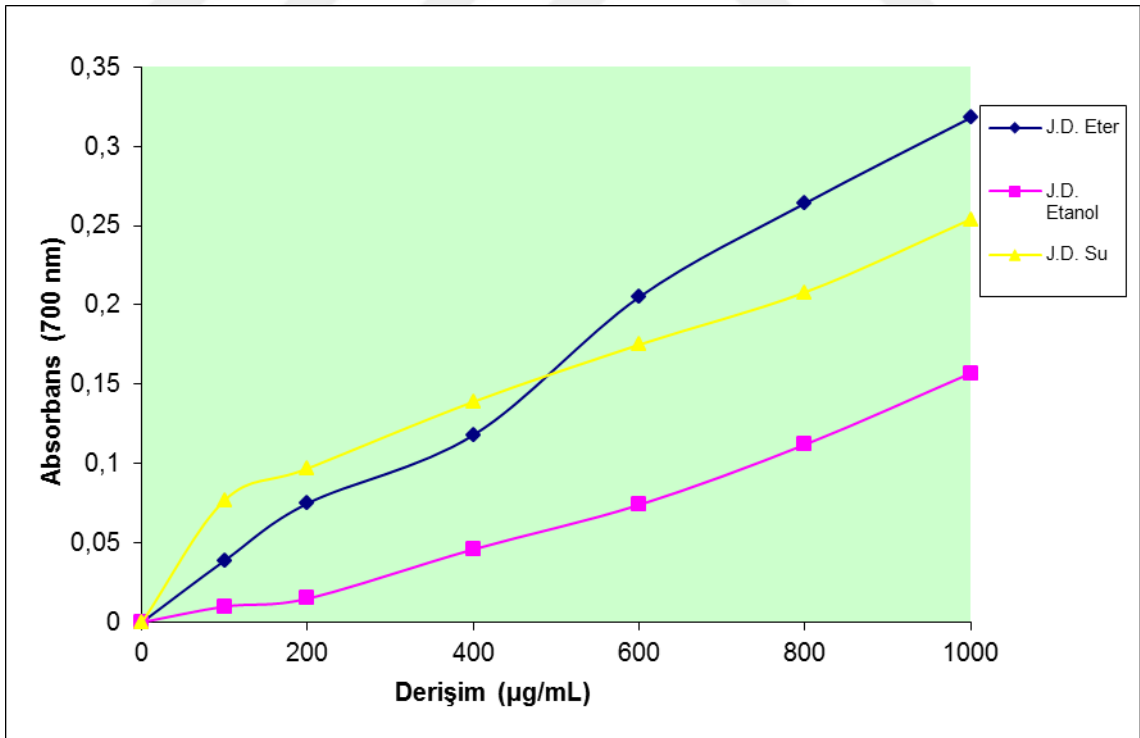
J.D. ve H.R. bitkilerinin ekstralarının indirgeme kuvvetleri Oyaizu yöntemine göre belirlendi.⁹² Ekstrelerin miktarları 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında alındı. Çalışmamızda tüm ekstraların belli bir indirgeme kuvveti aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. Sonuçlar Tablo 4.2 ve Şekil 4.4 - 4.6'da verildi. En yüksek aktivite J.D. bitkisi eter ekstresinde tespit edildi.

Tablo 4.2. J.D. ve H.R. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstralarının indirgeme kuvveti değerleri (n=6)

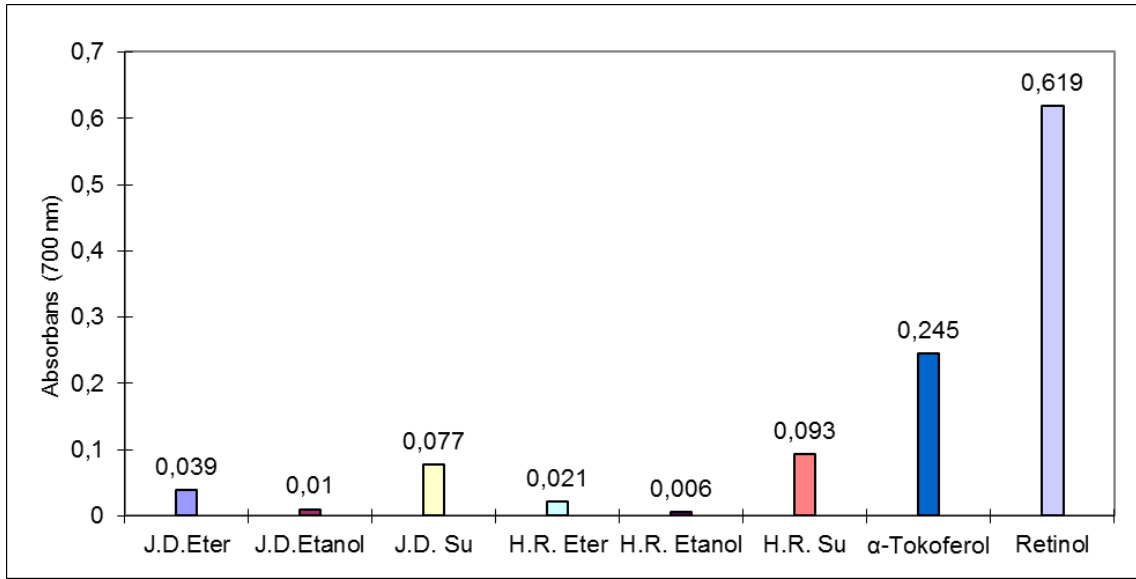
Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbans Değerleri 700 nm					
	J.D.			H.R.		
	Eter	Etanol	Su	Eter	Etanol	Su
100	0.039	0.01	0.077	0.021	0.006	0.093
200	0.075	0.015	0.097	0.026	0.058	0.102
400	0.118	0.046	0.139	0.07	0.069	0.146
600	0.205	0.074	0.175	0.104	0.085	0.195
800	0.264	0.112	0.208	0.122	0.097	0.244
1000	0.318	0.157	0.254	0.154	0.109	0.291



Şekil 4.4. H.R. bitkisi eter, etanol ve su ekstreleri indirgeme kuvvetlerinin derişime bağılılığı



Şekil 4.5. J.D. bitkisi eter, etanol ve su ekstrelerinin indirgeme kuvvetlerinin derişime bağılılığı



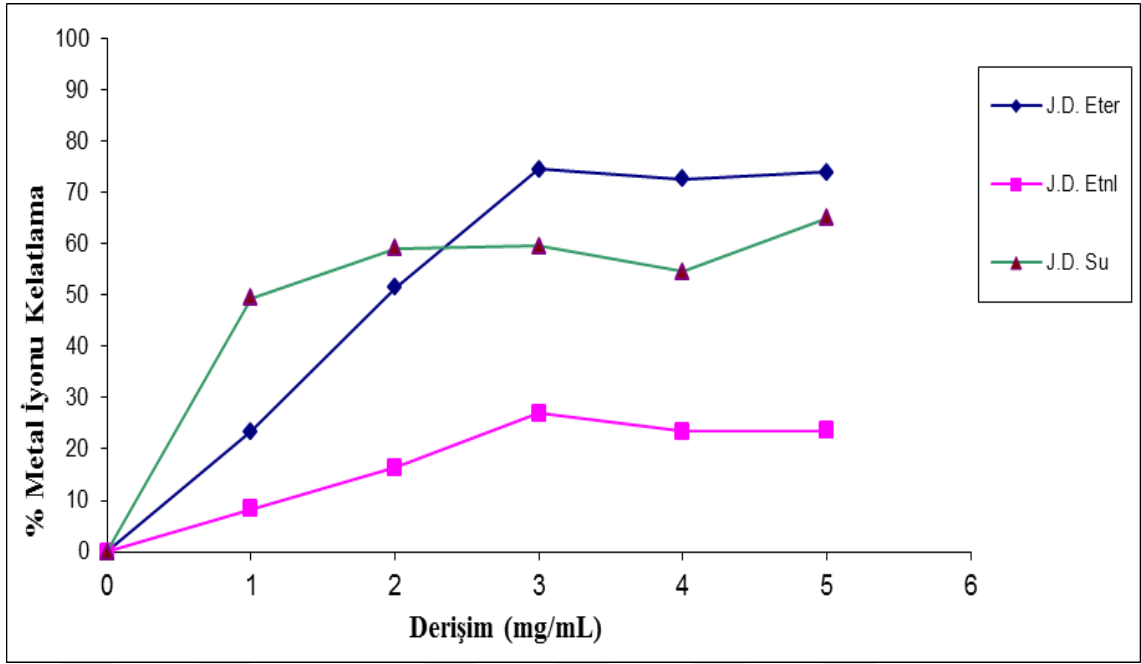
Şekil 4.6. Retinol, α-tokoferol ile J.D. ve H.R. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstralarının 100 µg/mL derişimlerdeki indirgeme kuvvetleri

4.1.3.Metal İyonu Kelatlama Aktivitesi

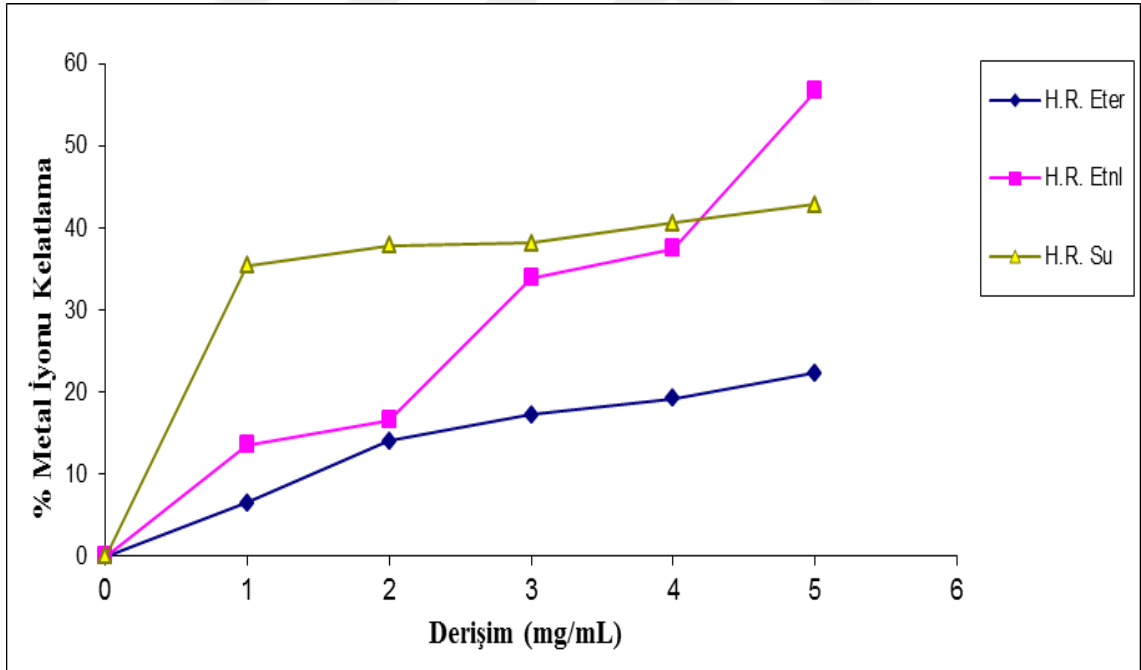
J.D. ve H.R. bitkileri eter, etanol ve su ekstralarının Fe^{2+} iyonlarını kelatlama aktivitesi Dinis ve ark.'nın⁹³ yöntemine göre yapıldı. Ekstrelerin metal iyonu kelatlama aktiviteleri derişime bağılı olarak araştırıldı. En fazla metal iyonu kelatlama aktivitesini J.D. bitkisi eter ekstresi gösterdiği tespit edildi (% 73.96). Sonuçlar Tablo 4.3 ve Şekil 4.7 - 4.9'da verildi.

Tablo 4.3. J.D. ve H.R. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstralarının Fe^{2+} iyonlarını kelatlama aktiviteleri (n=6)

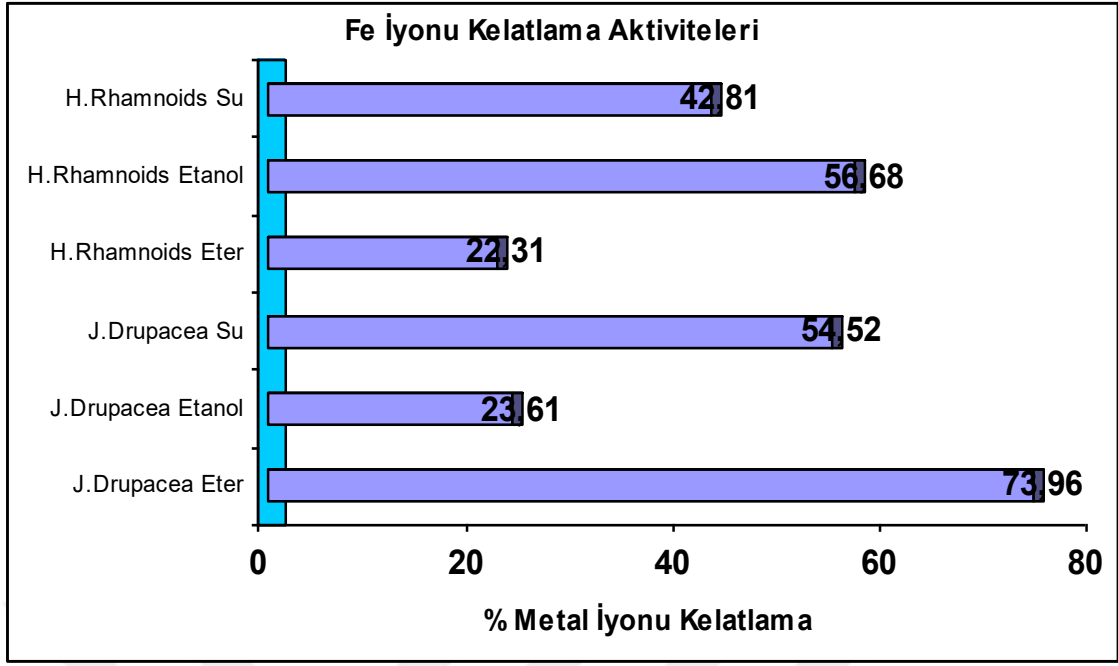
% Metal İyonu Kelatlama						
Derişim (mg/mL)	J.D.			H.R.		
	Eter Ekstresi	Etanol Ekstresi	Su Ekstresi	Eter Ekstresi	Etanol Ekstresi	Su Ekstresi
1	23.50	8.24	49.34	6.53	13.56	35.40
2	51.45	16.38	59.09	14.07	16.58	37.88
3	74.47	26.93	59.49	17.28	33.86	38.13
4	72.56	23.40	54.52	19.19	37.48	40.58
5	73.96	23.61	65.02	22.31	56.68	42.81



Şekil 4.7. J.D. bitkisinin eter, etanol ve su ekstralarının Fe^{+2} iyonlarını kelatlama aktiviteleri



Şekil 4.8. H.R. bitkisinin eter, etanol ve su ekstralarının Fe^{2+} iyonlarını kelatlama aktiviteleri

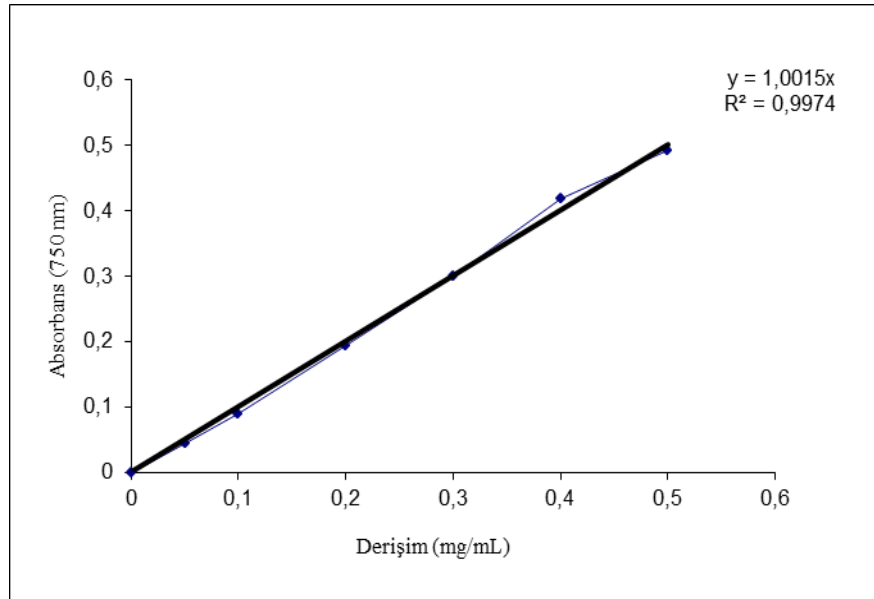


* EDTA için 5 mg/mL de aktivite değeri % 99.8' dir.

Şekil 4.9. H.R. ve J.D. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstraktlarının 5 mg/mL derişimde Fe^{2+} iyonlarını kelatlama aktiviteleri

4.1.4. Fenolik Bileşik Miktarı

Fenolik bileşik miktarı FCR yöntemiyle yapıldı.⁹⁴ Sonuçlar eşdeğer miktar gallik asit olarak ifade edildi (Tablo 4.4 ve Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Gallik asidin standart eğrisi

Tablo 4.4. H.R. ve J.D. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstralarının fenolik bileşiklerinin eşdeğer gallik asit olarak miktarı (n=6)

Eşdeğer Miktar Gallik Asit (mg/g ekstre)		
Ekstreler	H.R.	J.D.
Eter	62.73	64.71
Etanol	18.94	30.35
Su	41.94	34.74

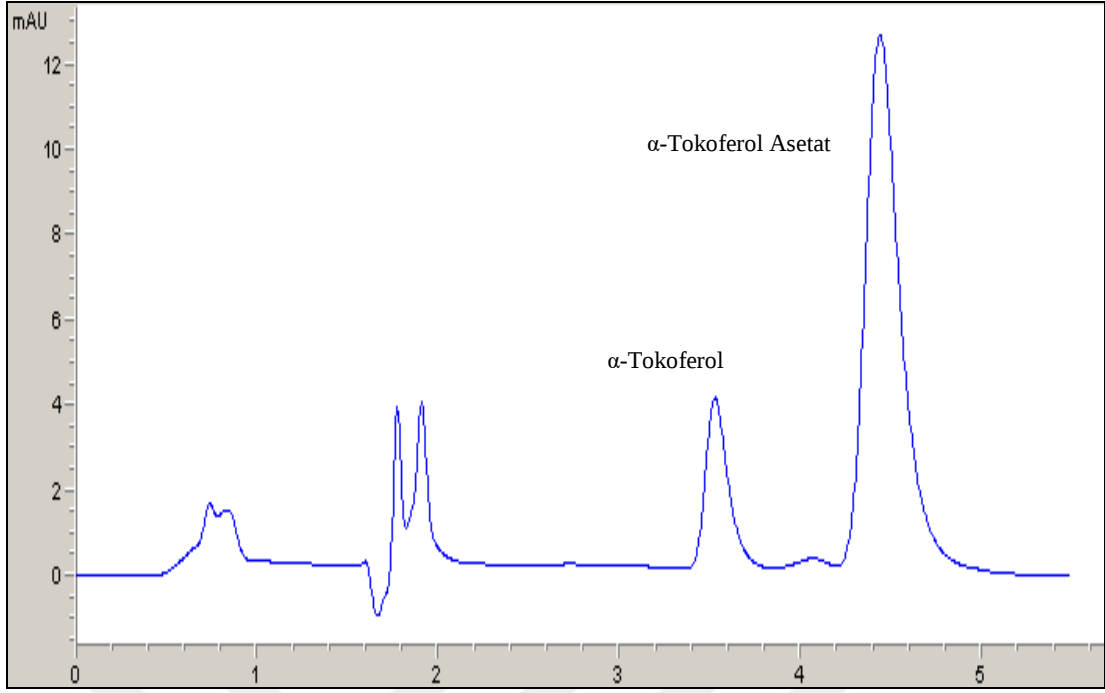
4.2. Kromatografik Yöntemler

4.2.1. HPLC Yöntemi

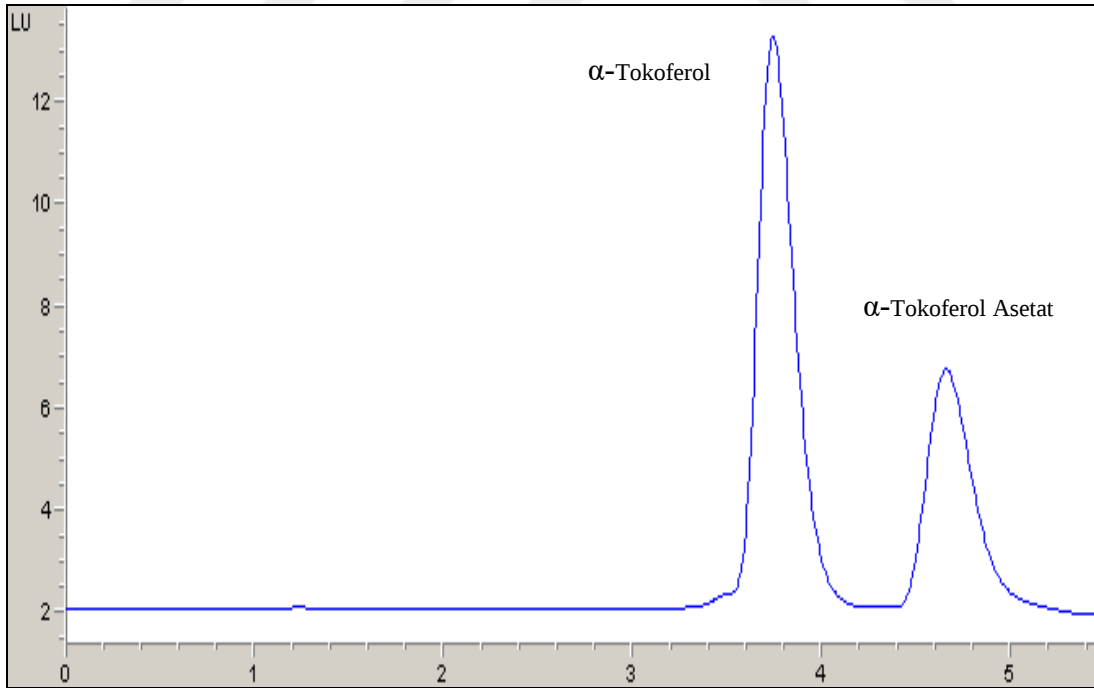
4.2.1.1. Standart Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

200 µg/mL'lik α - tokoferol stok çözeltisinden etanol ile 1.0, 2.5, 5, 10, 20, 30 ve 40 µg/mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve 1.5, 7.5 ve 25 µg/mL derişimlerde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. 200 µg/mL derişimde retinol çözeltisinden etanol ile seyreltilerek 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10 ve 20, µg/mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve 0.75, 3.0 ve 15 µg/mL derişimlerde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Çalışmamızda α - tokoferol asetat internal standart (IS) olarak kullanıldı. α -Tokoferol asetat (molekül ağırlığı: 452.8 g/mol) standartından 500 µg/mL derişime sahip stok çözelti hazırlandı. Çalışmalarda 200 µg/mL derişimde α - tokoferol asetat (İnternal Standart, IS) çözeltisi kullanıldı.

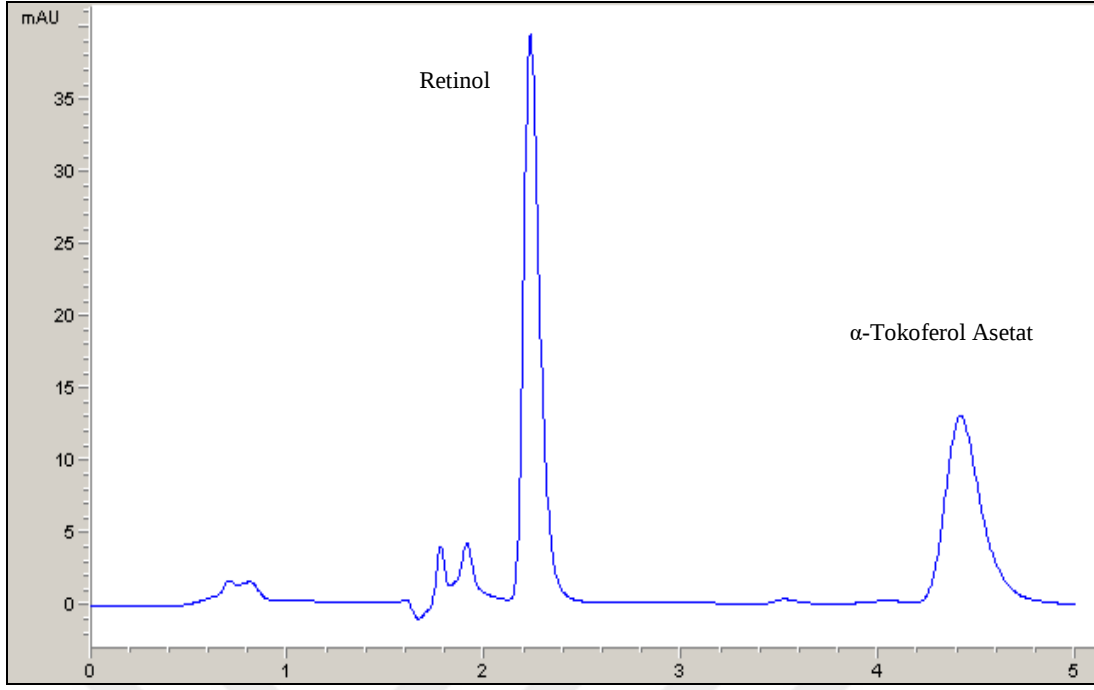
α -Tokoferol ve retinol standart çalışma çözeltilerine 200 µg/mL derişimde IS (α - tokoferol asetat) çözeltisi eklendi ve elde edilen çözeltiler HPLC sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.11 - 4.14'te verildi.



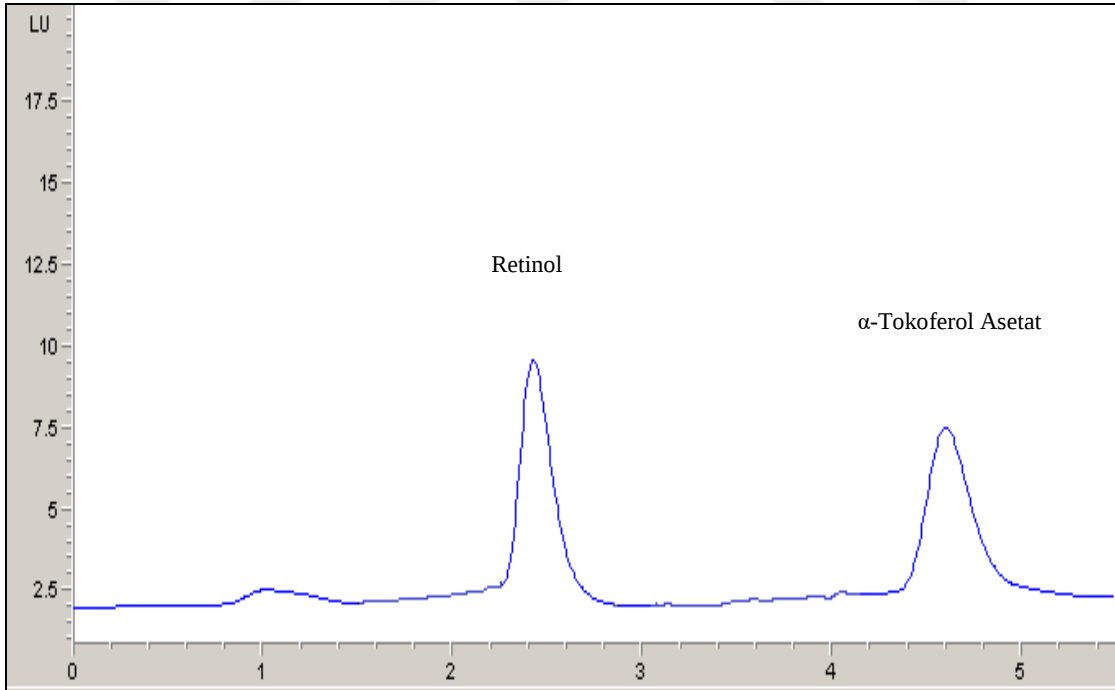
Şekil 4.11. 200 µg/mL derişimde IS içeren 10 µg/mL α -tokoferol standart çalışma çözeltisinin HPLC-UV kromatogramı



Şekil 4.12. 200 µg/mL derişimde IS içeren 10 µg/mL α -tokoferol standart çalışma çözeltisinin HPLC-Floresans kromatogramı



Şekil 4.13. 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimde IS içeren 10 $\mu\text{g/mL}$ retinol standart çalışma çözeltisinin HPLC-UV kromatogramı.

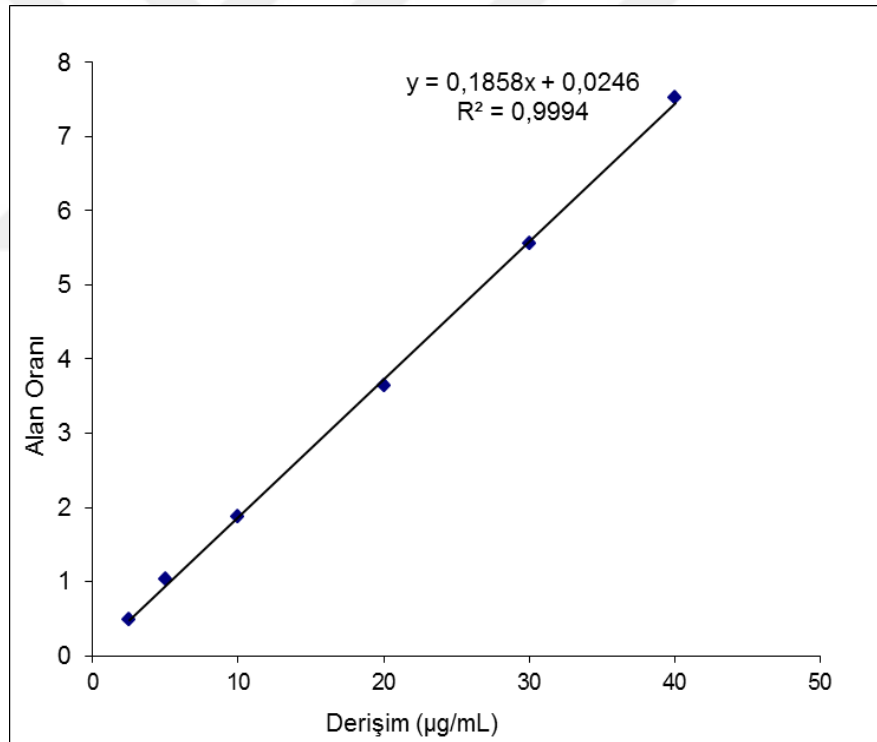


Şekil 4.14. 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimde IS içeren 10 $\mu\text{g/mL}$ retinol standart çalışma çözeltisinin HPLC-Floresans kromatogramı

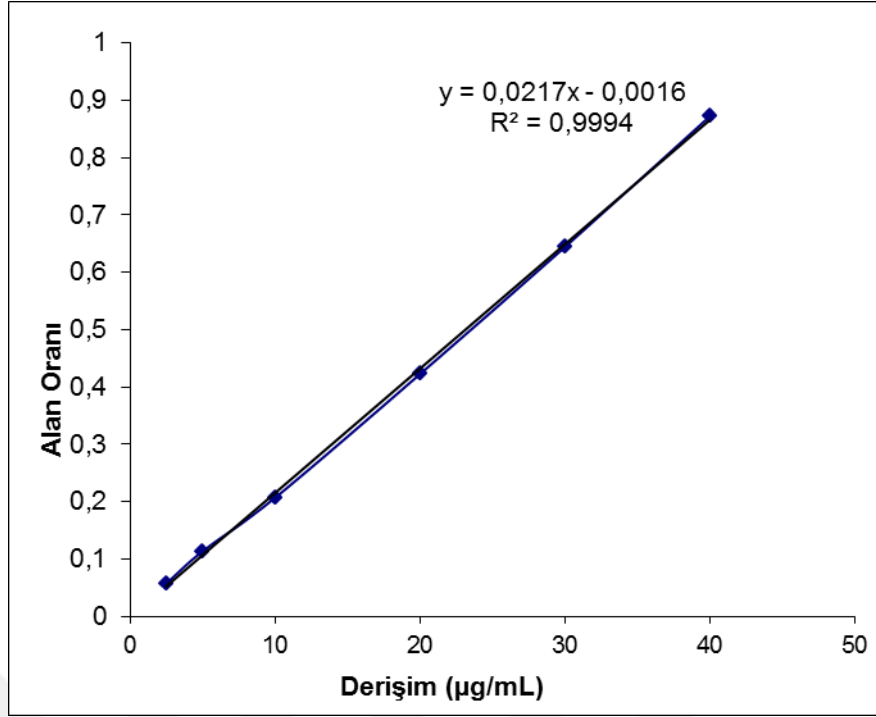
4.2.1.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusal Aralık

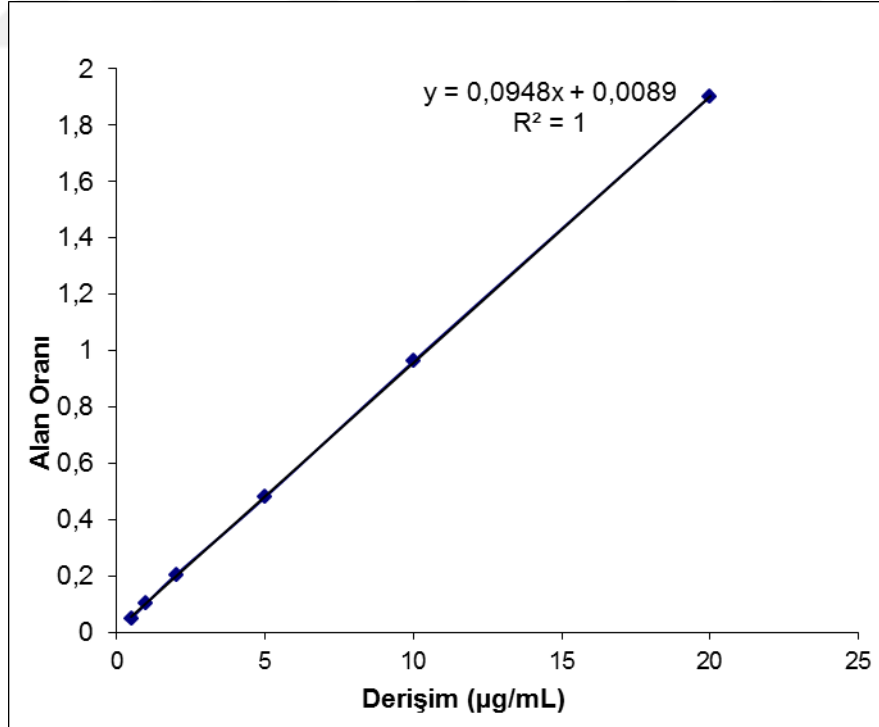
200 µg/mL derişimde IS bulunduran 1-40 µg/mL derişim aralığındaki α-tokoferol ve 0.5-20 µg/mL derişim aralığındaki retinol standart çalışma çözeltileri HPLC sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı. Kromatogramlardan maddelerin ve IS'ın pik alanları tespit edildi. Maddelerin (α-tokoferol ve retinol) derişimlerine karşılık maddelerin (α-tokoferol ve retinol) pik alanlarının IS'ın pik alanına oranları (α-tokoferol pik alanı/IS pik alanı ve retinol pik alanı/IS pik alanı) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri türetildi (Şekil 4.15 - 4.18).



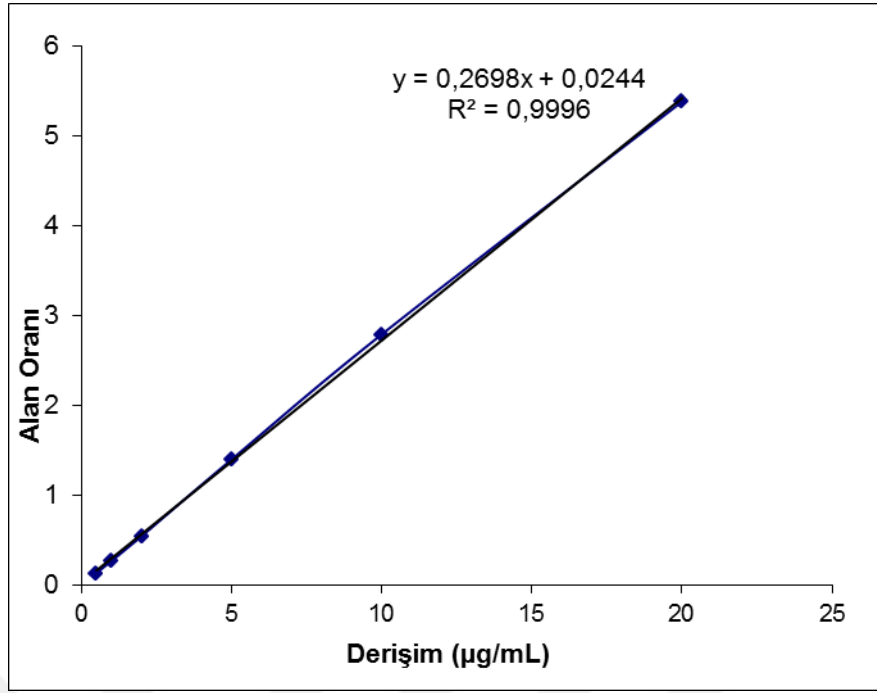
Şekil 4.15. HPLC-Floresans yöntemi ile elde edilen α-tokoferol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.16. HPLC-UV yöntemi ile elde edilen α -tokoferol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.17. HPLC-Floresans yöntemi ile elde edilen retinol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.18. HPLC-UV yöntemi ile elde edilen retinol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

HPLC-UV ve HPLC-Floresans yöntemlerinin α -tokoferol ve retinol için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4.5. α -tokoferol ve retinol standart maddeleri ile hazırlanan standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerine ait istatistiksel analiz değerleri

Yöntem	ÇA (µg/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R
HPLC-FD α -tokoferol	1-40	$y = 0.1858x + 0.0246$	0.0051	0.0158	0,9996
HPLC-UV α -tokoferol	1-40	$y = 0.0217x - 0.0016$	0.0003	0.0009	0,9996
HPLC-FD retinol	0.5-20	$y = 0.0948x + 0.0089$	0.0044	0.0022	0,9999
HPLC-UV retinol	0.5-20	$y = 0.2698x + 0.0244$	0.0024	0.0098	0,9998

ÇA: çalışma aralığı, a: 6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

ICH (International Conference on Harmonisation) kılavuzlarına uygun olarak HPLC yönteminin gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ) değerleri tespit edildi. İlk olarak UV ve floresans dedektörlerle HPLC sisteminde α -tokoferol ve retinol standart çalışma çözeltilerinin kromatogramları alındı. Bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranları tespit edilerek S/G oranı değerinin 3 olduğu derişim değeri LOD ve S/G oranı değerinin 10 olduğu derişim değeri LOQ olarak belirlendi. UV ve floresans dedektörlü HPLC yönteminin α -tokoferol için LOD değerleri sırasıyla 0.220 ve 0.053 $\mu\text{g/mL}$ LOQ değerleri ise sırasıyla 0.712 ve 0.150 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi. Retinol için UV ve floresans dedektörlü HPLC yönteminin LOD değerleri sırasıyla 0.025 ve 0.050 $\mu\text{g/mL}$ LOQ değerleri ise sırasıyla 0.100 ve 0.257 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.

Doğruluk ve Kesinlik

Güniçi ve günler arası değişkenler kullanılarak yöntemin doğruluğu ve kesinliği belirlendi. Hazırlanan üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 gün içinde 6 defa) ve günler arası (aynı yöntem ve aynı laboratuvar 6 farklı günde 6 defa) analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl hatası ve bağıl standart sapması belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla [% BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [%BSS = (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.6 - 4.9).

Tablo 4.6. Retinol için HPLC-UV yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS	Bulunan ± SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS
0.75	1.480±0.01	0.158	1.464	0.079±0.02	5.330	3.037
3	9.530±0.04	-2.337	1.296	2.850±0.04	-5.000	1.330
15	25.080±0.17	0.112	1.112	15.340±0.02	1.230	0.070

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma, n=6

Tablo 4.7. Retinol için HPLC-Floresans yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS	Bulunan ± SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS
0.75	0.801±0.01	6.840	1.180	0.816±0.01	7.800	1.715
3	3.260±0.02	7.720	0.459	3.292±0.04	7.733	1.245
15	15.840±0.09	5.660	0.561	16.840±0.18	7.260	1.080

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma, n=6

Tablo 4.8. α-Tokoferol için HPLC-Floresans yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Güniçi			Günler arası		
	Bulunan±SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS	Bulunan ± SS (µg/mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS
1.5	1.460±0.01	-2.660	0.020	1.410±0.01	-6.00	0.822
7.5	7.410±0.01	-1.200	0.040	7.120±0.01	-5.060	0.136
25	24.600±0.01	-1.600	0.048	24.530±0.04	-1.880	0.070

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma, n=6

Tablo 4.9. α -Tokoferol için HPLC-UV yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

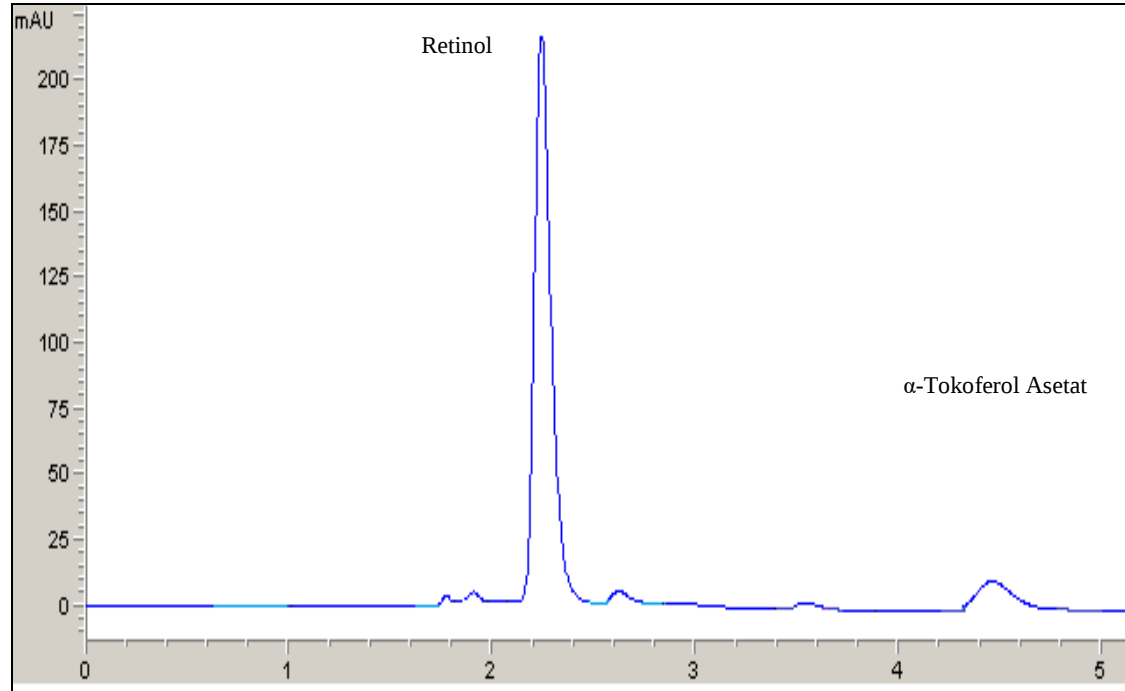
Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Gün içi			Günler arası		
	Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS	Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g/mL}$)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS
1.5	1.480 $\pm$ 0.01	-1.330	0.140	1.460 $\pm$ 0.01	-2.660	0.822
7.5	7.430 $\pm$ 0.01	-0.930	0.027	7.350 $\pm$ 0.01	-2.000	0.136
25	25.070 $\pm$ 0.01	0.280	0.044	24.630 $\pm$ 0.02	-1.480	0.070

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma, n=6

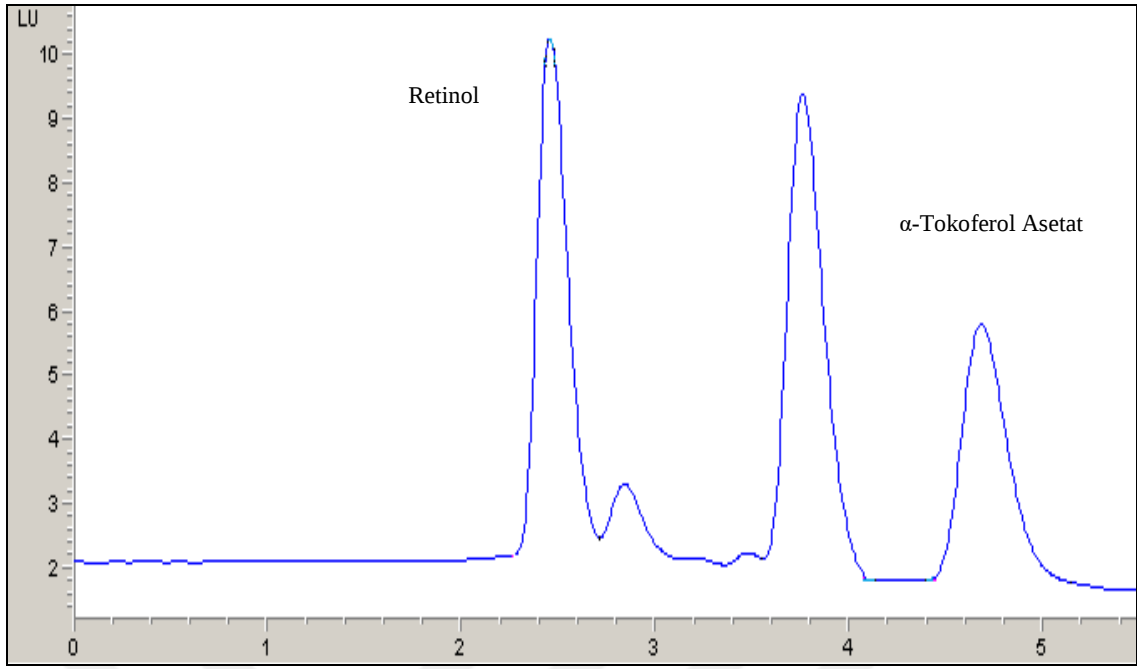
4.2.2. HPLC Doku Çalışması

4.2.2.1. Doku Çözeltilerinin Hazırlanması ve Analizi

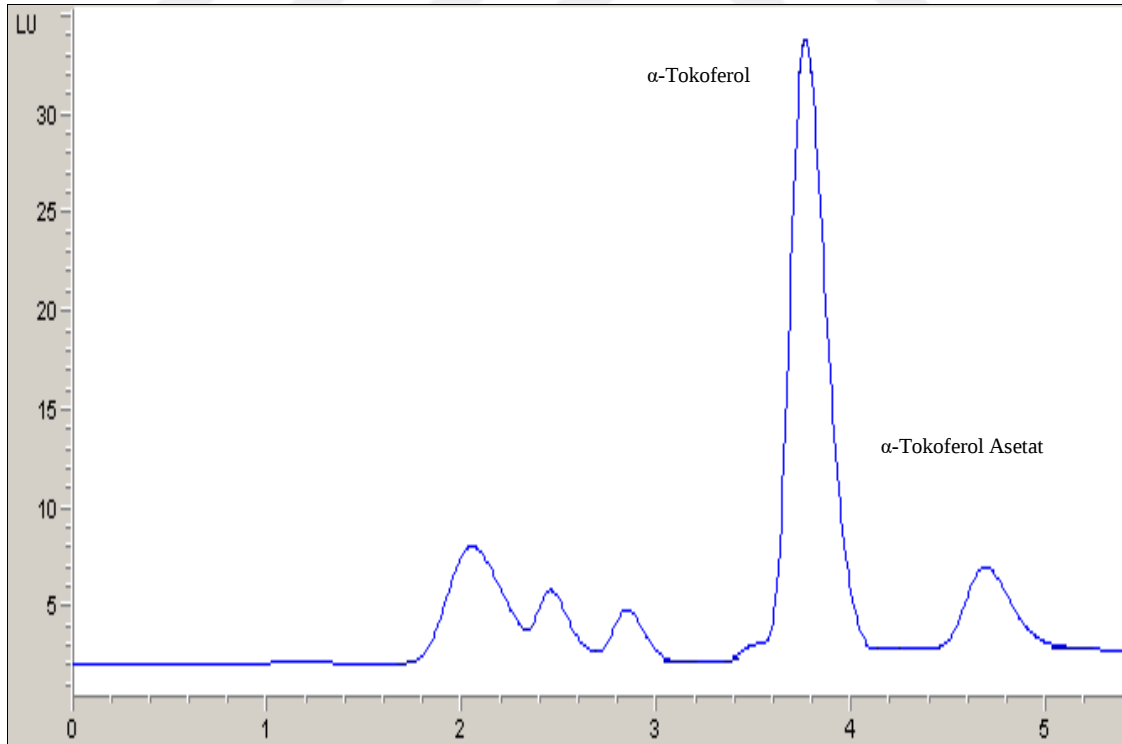
Atatürk Üniversitesi, Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden alınan ratların karaciğer dokularından α -tokoferol ve retinol için sırasıyla 1-40 $\mu\text{g/mL}$ ve 0.5-20 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralıklarında ve 200 $\mu\text{g/mL}$ IS içerecek şekilde ekstraksiyon yapıldı ve HPLC sistemine verildi. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.19- 4.23’de verildi.



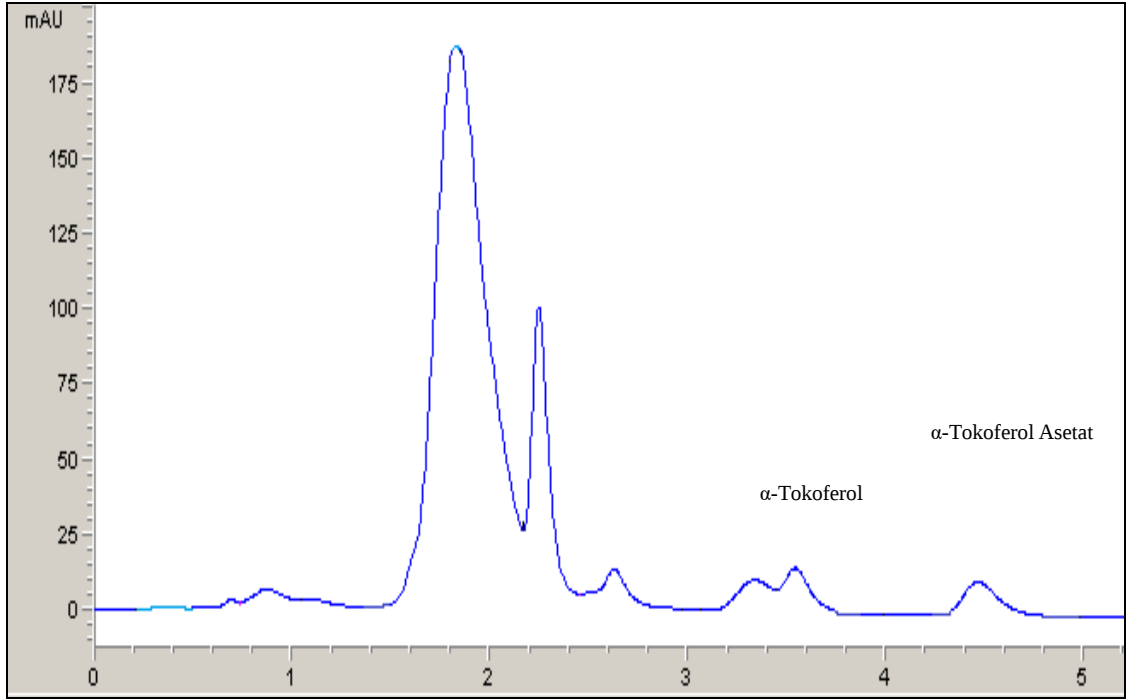
Şekil 4.19. 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimde IS ve 10 $\mu\text{g/mL}$ derişimdeki retinol içeren doku çözeltilerinin ekstraksiyonu sonucu HPLC-UV kromatogramı



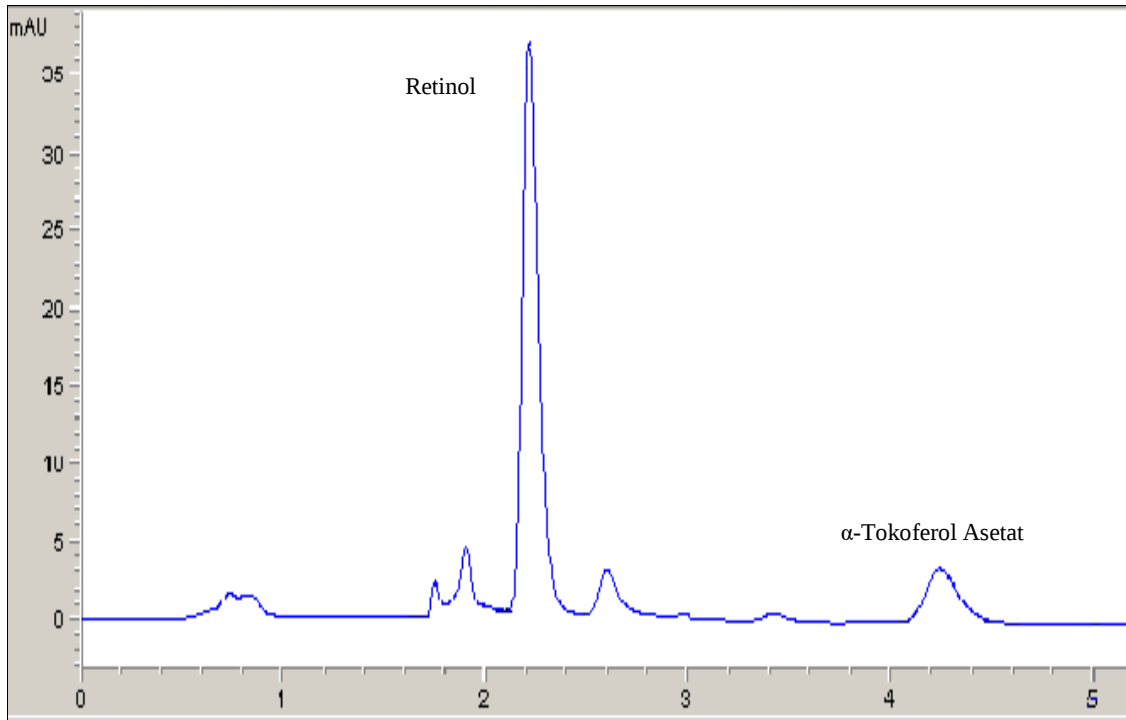
Şekil 4.20. 200 µg/mL derişimde IS ve 10 µg/mL derişimdeki retinol içeren doku çözeltilerinin ekstraksiyonu sonucu HPLC-Floresans kromatogramı



Şekil 4.21. 200 µg/mL derişimde IS ve 30 µg/mL derişimdeki α-tokoferol içeren doku çözeltilerinin ekstraksiyonu sonucu HPLC-Floresans kromatogramı



Şekil 4.22. 200 µg/mL derişimde IS ve 30 µg/mL derişimdeki α-tokoferol içeren doku çözeltilerinin ekstraksiyonu sonucu HPLC-UV kromatogramı

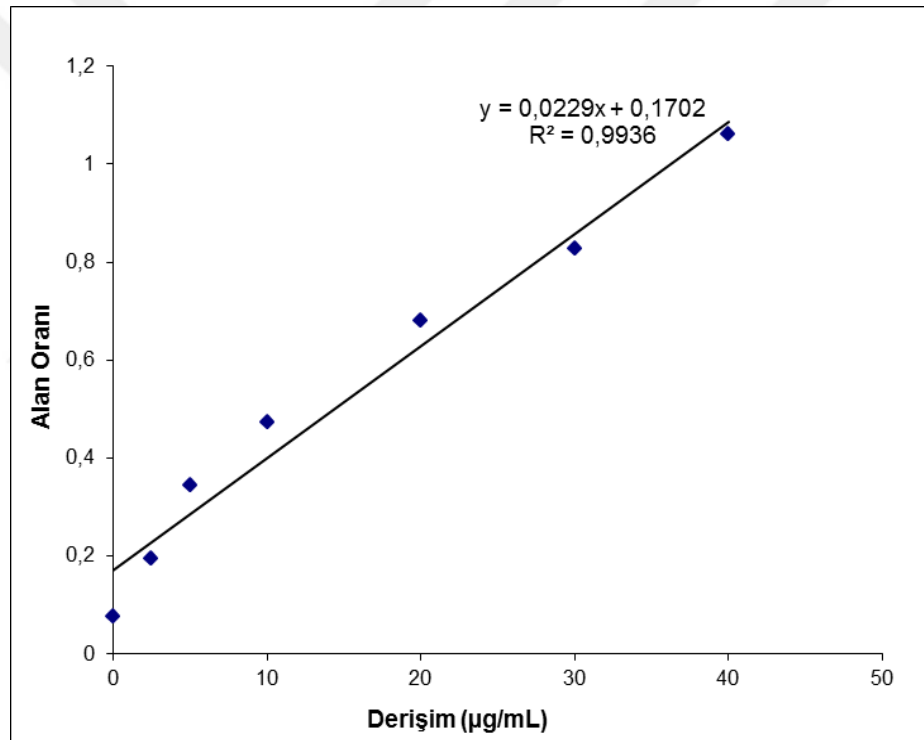


Şekil 4.23. Kontrol grubu dokunun HPLC-UV kromatogramı

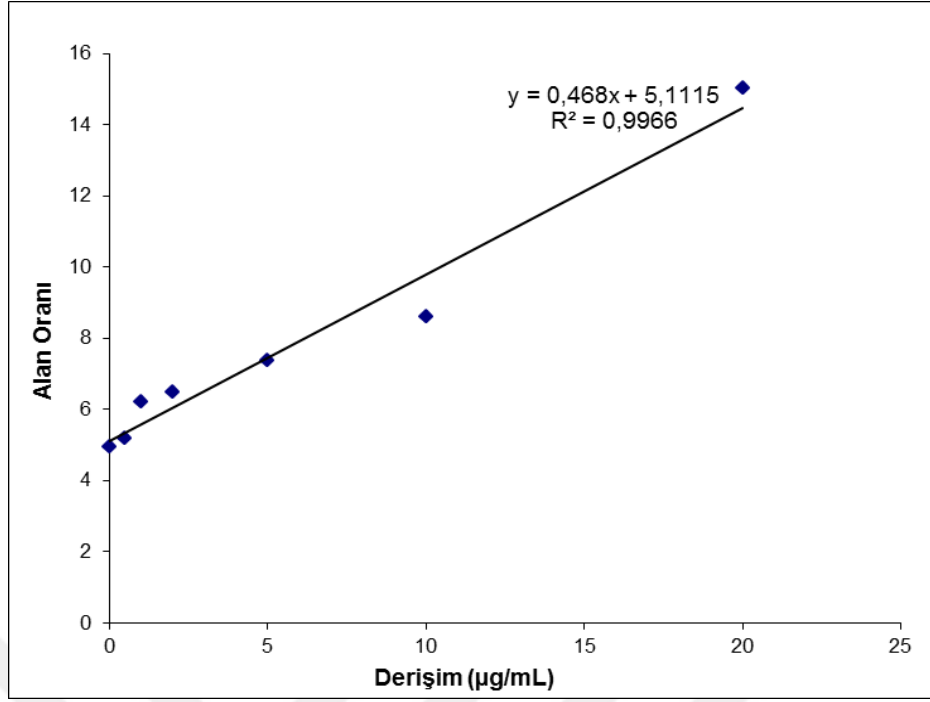
4.2.2.2. Yöntem Geçerlilik Testleri ve Sonuçlar (Validasyon)

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusal Aralık

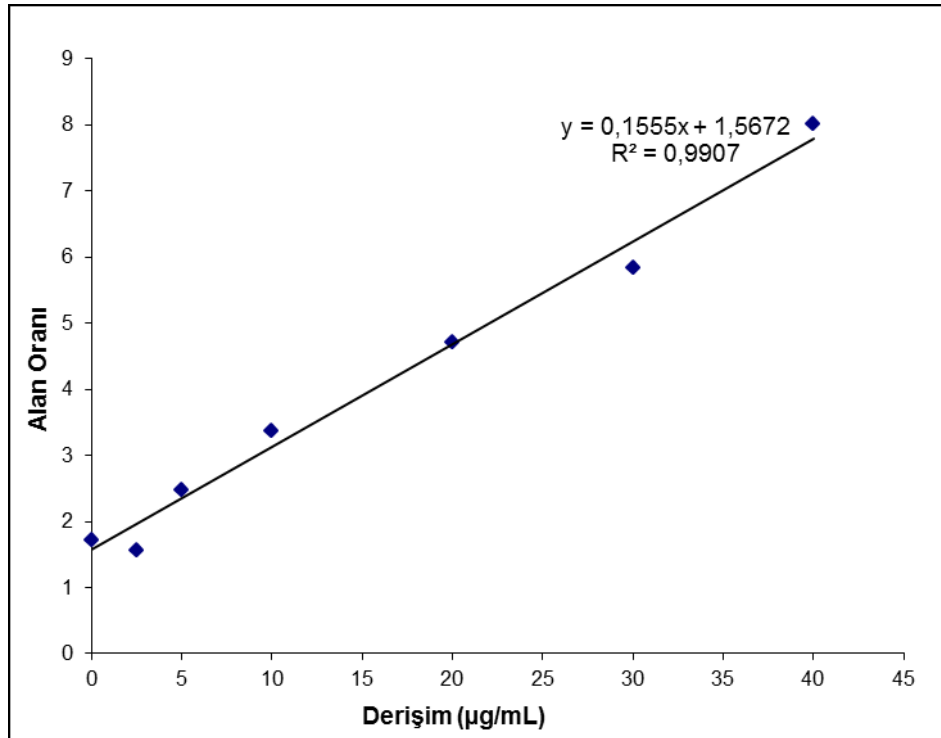
Ratların karaciğer dokularından α -tokoferol ve retinol için sırasıyla 1-40 $\mu\text{g/mL}$ ve 0.5-20 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralıklarında ve 200 $\mu\text{g/mL}$ IS içerecek şekilde ekstraksiyon yapıldı ve HPLC sistemine enjekte edildi. Kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. α -Tokoferol ve retinol çözelti derişimlerine karşı, α -tokoferol ve retinol pik alanlarının IS pik alanına oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.24 - 4.27).



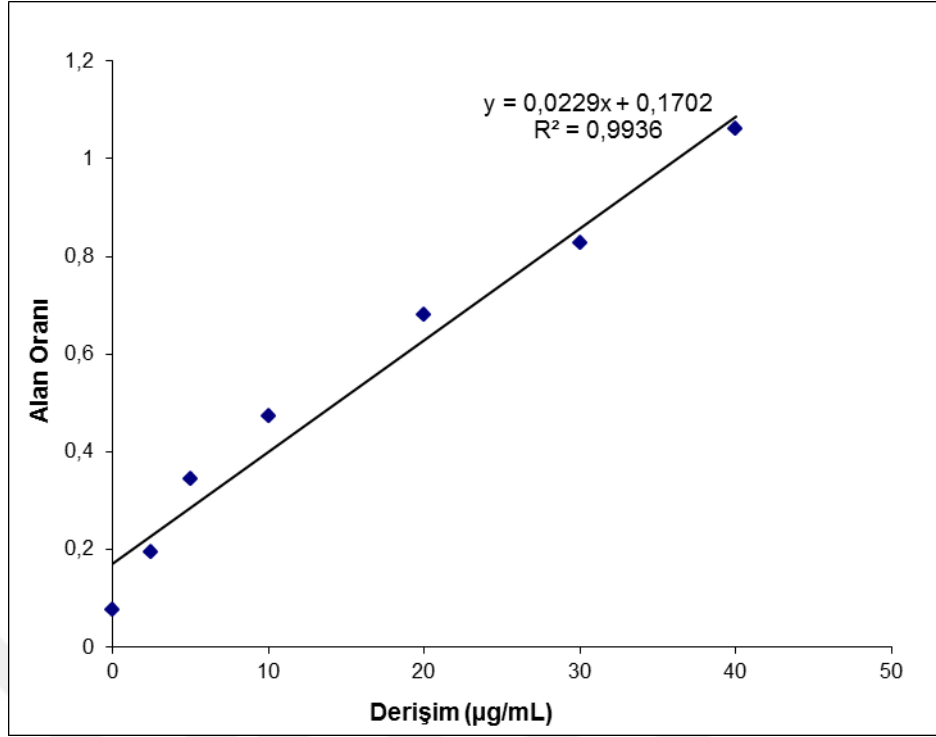
Şekil 4.24. Doku çalışmasında HPLC-Floresans yöntemi ile elde edilen retinol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.25. Doku çalışmasında HPLC-UV yöntemi ile elde edilen retinol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.26. Doku çalışmasında HPLC-Floresans yöntemi ile elde edilen α -tokoferol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.27. Doku çalışmasında HPLC-UV yöntemi ile elde edilen α -tokoferol standart çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

Doku örneklerinde HPLC-UV ve HPLC-Floresans yöntemlerinin α -tokoferol ve retinol için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10. Doku örneklerinden ekstrakte edilen α -tokoferol ve retinol için hazırlanan kalibrasyon eğrilerine ait istatistiksel analiz değerleri

Yöntem	ÇA ($\mu\text{g/mL}$)	LR ^a	Sa	Sb	R
HPLC-FD α -tokoferol	1-40	$y = 0.1555x + 1.5672$	0.0042	0.0394	0,9953
HPLC-UV α -tokoferol	1-40	$y = 0.0229x - 0.1702$	0.0316	0,0035	0,9968
HPLC-FD retinol	0.5-20	$y = 0.0804x + 0.6937$	0.0050	0.0025	0,9983
HPLC-UV retinol	0.5-20	$y = 0.4680x + 5.1115$	0.0025	0.0103	0,9961

ÇA: çalışma aralığı, a: 6 analiz sonucunun ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı

Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Doku çalışmasında, FAD (Food and Drug Administration) kılavuzlarına uygun olarak HPLC yönteminin LOQ ve LOD değerleri tayin edildi. Doku örneklerinden elde edilen α -tokoferol ve retinol çözeltilerinin UV ve Floresans dedektörlü HPLC sisteminde kromatogramları alındı. Bu kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranı değerinin 3 olduğu derişim değeri LOD ve S/G oranı değerinin 10 olduğu derişim değeri ise LOQ olarak belirlendi. α -Tokoferol için UV ve floresans dedektörlerlü HPLC yönteminin LOD değerleri sırasıyla 0.670-0.120 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ değerleri ise sırasıyla 1.964-0.281 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi. Retinol için UV ve floresans dedektörlerlü HPLC yönteminin LOD değerleri sırasıyla 0.400-0.950 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ değerleri ise sırasıyla 1.232 – 0.257 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.

Doğruluk, Kesinlik ve Geri Kazanım

Yöntemin doğruluğu, kesinliği gün içi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Hazırlanan üç farklı derişimdeki kalite kontrol çözeltileri ve 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimdeki IS çözeltisi dokuya eklenip ekstrakte edildikten sonra doku kalite kontrol çözeltileri elde edildi. Bu çözeltilerde günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 gün içinde 6 defa) ve günler arası (aynı laboratuvarda aynı yöntem ile 6 farklı günde 6 defa) analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl hatası ve bağıl standart sapması değerleri belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla [% BH= (bulunan değer-eklenen değer)/eklenen değer) x100] ve kesinlik bağıl standart sapma ile [% BSS = (SS/bulunan değer) x 100] verildi (Tablo 4.11 - 4.14).

Tablo 4.11. Doku örneklerinde retinol için HPLC-Floresans yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Güniçi					Günler Arası			
Eklenen (µg/mL)	Bulunan±SS (µg /mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% Geri Kazanım	Bulunan±SS (µg /mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% Geri Kazanım
0.75	0.755±0.02	0.710	2.135	100.666	0.780±0.05	4.000	6.153	104.000
3	2.920±0.04	-2.660	3.253	97.333	2.830±0.10	-5.666	3.356	94.330
15	14.780±0.08	-1.466	0.563	98.533	14.640±0.10	-2.400	0.696	97.600

SS: standart sapma, BH: bağıl hata, BSS: bağıl standart sapma, n=6

Tablo 4.12. Doku örneklerinde retinol için HPLC-UV yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Güniçi					Günler Arası			
Eklenen (µg/mL)	Bulunan±SS (µg /mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% Geri Kazanım	Bulunan±SS (µg /mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% Geri Kazanım
0.75	0.779±0.14	3.866	8.100	103.866	0.786±0.19	4.800	7.660	104.800
3	3.008±0.25	0.266	8.144	100.266	3.120±0.26	4.000	8.420	104.000
15	14.800±0.38	-1.333	2.513	98.666	14.650±0.41	-2.330	2.812	97.667

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma, n=6

Tablo 4.13. Doku örneklerinde α -tokoferol için HPLC-Floresans yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Gün içi					Günler Arası			
Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g /mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% Geri Kazanım	Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g /mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% Geri Kazanım
1,5	1.406 $\pm$ 0.02	-6.266	1.066	93.733	1.387 $\pm$ 0.02	-7.533	1.730	92.467
7,5	7.480 $\pm$ 0.02	-0.266	0.227	99.733	7.320 $\pm$ 0.04	-2.400	0.532	97.600
25	25.506 $\pm$ 0.32	2.024	0.127	102.024	25.820 $\pm$ 0.51	3.280	1.982	103.280

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma, n=6

Tablo 4.14. Doku örneklerinde α -tokoferol için HPLC-UV yönteminin doğruluk ve kesinlik değerleri

Güniçi					Günler Arası			
Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g /mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% Geri Kazanım	Bulunan $\pm$ SS ($\mu\text{g /mL}$)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	% Geri Kazanım
1.5	1.469 $\pm$ 0.10	-2.066	6.650	97.933	1.452 $\pm$ 0.10	-3.200	6.577	96.800
7.5	7.767 $\pm$ 0.13	3.560	1.712	103.560	7.813 $\pm$ 0.16	4.173	2.086	104.173
25.0	25.157 $\pm$ 0.15	0.628	0.608	100.628	25.184 $\pm$ 0.52	0.736	2.068	100.736

SS: standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma, n=6

4.3. Gerçek Numunelerde-Hayvan Dokularında α -Tokoferol ve Retinol

Analizleri

Bölüm 3.2.2.2’de verildiği şekilde ratlara bitki ekstraları verildi ve karaciğer dokuları ile kan numuneleri alındı. Dokularda α -tokoferol ve retinol miktar tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.15’te verildi.

Tablo 4.15. Hayvan gruplarında retinol ve α -tokoferol analiz sonuçları

Grup Adı	UV DEDEKTÖR		FLORESANS DEDEKTÖR	
	RETİNOL MİKTARI	α -TOKOFEROL MİKTARI (μ g/0.1 g Doku)	RETİNOL MİKTARI	α -TOKOFEROL MİKTARI
Negatif Kontrol (CCl ₄)	1.78	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi
Zeytinyağı	12.124	Ölçülemedi	10.285	2.541
Çalı Gagası Su Ekstresi +CCl ₄	2.651	Ölçülemedi	2.625	Ölçülemedi
Çalı Gagası Su Ekstresi	11.356	2.58	6.942	3.103
Çalı Gagası Etanol Ekstresi +CCl ₄	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi
Çalı Gagası Etanol Ekstresi	7.158	Ölçülemedi	5.963	3.354
Andız Su Ekstresi+CCl ₄	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi
Andız Su Ekstresi	1.35	Ölçülemedi	Ölçülemedi	3.842
Andız Etanol Ekstresi +CCl ₄	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi	0.215
Andız Etanol Ekstresi	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi	3.347
Çalı Gagası Eter Ekstresi+CCl ₄	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi
Çalı Gagası Eter Ekstresi	Ölçülemedi	Ölçülemedi	0.62	0.635
Andız Eter Ekstresi +CCl ₄	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi
Andız Eter Ekstresi	1.071	Ölçülemedi	0.410	1.320
Kontrol	9.125	12.365	6.53	5.734

4.4. Biyokimyasal Çalışmalar

Deney Hayvanlarından alınan kan numuneleri ALT, AST çalışması için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yakutiye Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında yapıldı. Hayvan gruplarına göre elde edilen sonuçlar Tablo 4.16’da verildi.

Tablo 4.16. Hayvan deney gruplarının ALT ve AST değerleri

HAYVAN GRUBU	AST	ALT
Kontrol	163	45
Negatif Kontrol (CCl ₄)	2858	516
Çalı Gagası Su Ekstresi+CCl ₄	1002	318
Çalı Gagası Su Ekstresi	75	37
Çalı Gagası Etanol Ekstresi +CCl ₄	3849	841
Çalı Gagası Etanol Ekstresi	135	52
Andız Su Ekstresi+CCl ₄	2251	1237
Andız Su Ekstresi	80	38
Andız Etanol Ekstresi +CCl ₄	4283	1082
Andız Etanol Ekstresi	107	46
Çalı Gagası Eter Ekstresi+CCl ₄	2316	936
Çalı Gagası Eter Ekstresi	140	68
Andız Eter Ekstresi +CCl ₄	883	215
Andız Eter Ekstresi	75	36
Zeytinyağı	121	90

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Mersin yöresinden toplanan andız (J.D.) ve Erzurum Tortum yöresinden toplanan yabani iğde veya çalı gagası (H.R.) bitkilerinden elde edilmiş eter, etanol ve su ekstralarının radikal giderme, metal iyonunu (Fe^{2+}) kelatlama aktiviteleri ile indirgeme güçleri incelendi. Ayrıca doğal antioksidanlar olarak α - tokoferol ve vitamin C aynı zamanda sentetik antioksidanlar BHA ve BHT standart antioksidanlar olarak kullanıldı. Ekstrelerin antioksidatif etkilerinin nedenini daha iyi açıklamak için ekstralarda toplam fenolik özellikli bileşiklerin miktarları belirlendi. UV-Görünür Bölge Spektrofotometrik yöntemle ekstraların başlıca bileşenleri belirlendi ve antioksidan etkinin izlenmesi yapıldı. Ayrıca retinol ve α - tokoferolün antioksidan etkilerinin olduğu bilindiğinden ratlarda karaciğer toksisitesi oluşturulup bitki ekstraları verildikten sonra rat karaciğer dokularında retinol ve α - tokoferolün eş zamanlı olarak miktar tayinleri UV ve Floresans dedektörlü HPLC yöntemiyle gerçekleştirildi. Karaciğer dokularında retinol ve α - tokoferolün HPLC yöntemiyle miktar tayininden önce ekstarksiyon işleminin yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada karaciğer dokularından retinol ve α - tokoferolün ekstraksiyonu için Karataş ve Kamışlı⁹⁵ tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanıldı. UV dedektörlü HPLC yöntemiyle retinol ve α - tokoferolün karaciğer dokularında miktar tayini için literatürde mevcut olan yöntemler modifiye edilerek uygulandı. Ayrıca karaciğer dokusunda retinol ve α - tokoferolün eş zamanlı miktar tayini için floresans dedektörlü HPLC yöntemi de geliştirilip valide edildi ve karaciğer toksitesi oluşturulmuş ratların karaciğer dokularında miktar tayini gerçekleştirildi.

Yapılan literatür taramasında bu iki bitkinin meyvelerinin antioksidan aktivite yönünden çalışıldığına dair herhangi bir kaynağa ulaşılamadı. Bundan dolayı bu çalışmada bu bitkilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaç edinildi. Bitkilerin

antioksidan aktivitelerini belirlemek için, genelde polar çözücülerle (metanol, etanol, su v.b.) ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrelerin incelenmesi yaygındır. Bu tür ekstraksiyon işleminin uygulanması bitki örneklerinde bulunan farklı polariteli başka deyimle hem polar hem de apolar özellikli biyokimyasalların elde edilmesine imkân vermemektedir. Bu yetersizliği ortadan kaldırmak için çalışmamızda bitki örneklerinin ekstraksiyonu farklı polariteye sahip çözücüler (eter, etanol ve su) uygulanarak yapıldı. Ekstraksiyon işlemleri çözücülerin polaritesinin artma sırasına göre yapılmıştır (eter < etanol < su). Ekstraksiyon işleminde uygulanan çözücüler farklı polariteye sahip olmalarının yanı sıra su toksik değil (zararsız), etanol genellikle besin endüstrisinde kullanılmaktadır ve eter ise ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. Bu çözücüler besin endüstrisi için toksik olmadıklarından yani zararsız olduklarından dolayı çalışmamızda ekstraktant olarak seçildiler.

Literatür taramasında bitki ekstrelerinin antioksidan aktivelerinin belirlenmesinde genellikle DPPH serbest radikal giderme yöntemi ve indirgeme kuvveti tayin yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. DPPH serbest radikal giderme yöntemi antioksidanların serbest radikallere proton veya elektron vererek serbest radikalleri giderme aktivitesini ölçmektedir. Bu yöntemle belirlenmiş antioksidan aktivite değerlerini karşılaştırarak kullanılan antioksidanın etki mekanizmasının serbest radikalleri giderme yöntemi ile gerçekleştiğini açıklamak mümkündür.

Çalışmada uygulanan DPPH giderme yöntemi ekstrelerin ve saf bileşiklerin antioksidan kapasitesini belirlemek için kullanılan spektrofotometrik yöntemler arasında çok yaygındır. Bu yöntem hızlıdır, örnek analizi az zaman gerektirir, pahalı ayıraç ve cihazlar gerektirmez. Dayanıklı serbest bir radikal olan DPPH reaksiyon ortamından elektron veya hidrojen radikali alarak dayanıklı diamagnetik moleküle dönüşür. Bu sebepten de, DPPH radikali antioksidanların antioksidatif özelliklerini belirlemek için

bir substrat olarak kullanılır.⁴² Bu dayanıklı kromojen serbest radikal, yüksek duyarlılığa sahiptir. DPPH yöntemi farklı özellikli örneklerin analizine imkân veren çağdaş bir yöntemdir. Bu kromojen radikal uygulanarak çok sayıda saf bileşiklerin, meyve öz sularının, şarapların, çay ve diğer ekstrelerin analizi yapılmıştır.⁹⁶⁻⁹⁹ Çok iyi olarak bilinmektedir ki, serbest radikaller besinlerde doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonunda başlıca role sahiptirler.¹⁰⁰ Örneğin adale kolesterolünün oksidasyonu doymamış yağ asitlerinin sırasında oluşan serbest radikaller tarafından uyarılır.¹⁰¹ Radikal zincir reaksiyonu lipid peroksitleşme sürecinin kabullenmiş mekanizmasıdır. Radikal gidericiler ise direkt olarak peroksit radikalleri ile reaksiyona girerek bu süreçleri söndürebilirler. Sonuçta zincir reaksiyonu sonlanmış olur ve böylece besin ürünlerinin kalite ve dayanıklılıkları muhafaza edilmiş olur.^{74,59} Bu nedenle de serbest radikal gidericilere büyük ihtiyaç duyulmaktadır.

H.R. ve J.D. bitkilerinin eter, etanol ve su ekstreleri DPPH radikal giderme denemesinde antioksidan etki göstermişlerdir (Tablo 4.1). Elde edilen sonuçlar her şeyden önce ekstrelerin radikal giderme yeteneğinin bir göstergesidir. DPPH 517 nm’de karakteristik absorpsiyona sahip dayanıklı bir radikaldır ve DPPH’nın reaksiyon ortamdaki miktarı radikal gideren bileşiklerin derişimine bağlı olarak önemli derecede azalır.⁷³ Antioksidan bileşiklerin etkisiyle DPPH miktarının azalmasının antioksidanların hidrojen vermesinden kaynaklandığı belirlenmiştir.⁹⁶

Ekstrelerin DPPH giderme aktivitesi 100-1000 µg/mL derişim aralığında araştırıldı. DPPH giderme aktivitesinin ölçümlerinde standart olarak doğal antioksidanlar α -tokoferol, askorbik asit ve sentetik antioksidan olan BHT kullanıldı. DPPH giderme aktiviteleri ekstrelerin uygulanan derişimine bağlı olarak belli bir oranda artış gösterdi ($r^2 > 0.96$). Bu etki ekstre miktarına bağlı olarak serbest radikal giderme aktivitelerinin de artmasından kaynaklanmaktadır. Radikal giderme aktivite tayininde

elde edilen sonuçlar antioksidan/DPPH oranına bağlı olarak değişmektedir. Elde edilen bulguların doğru olarak değerlendirilebilmesi için bu oranın belirlenmesi oldukça önemlidir. Çünkü reaksiyon ortamında DPPH derişimi düşük oldukça antioksidanın aynı derişimi için radikali giderme değeri büyük olacaktır. Bu da ekstreler tarafından giderilebilecek radikal miktarından kaynaklanmaktadır. Bu yüzden DPPH'ın kullanılan miktarı önemlidir. Çalışmada DPPH'ın başlangıç derişimi 100 µg/mL (% 0.01 ya da 0.25mM) dır. H.R. bitkisi ekstrelerinin 1000 µg/mL derişimde DPPH radikalini (100 µg/mL) giderme aktiviteleri; eter ekstreleri için % 28.3, etanol ekstreleri için % 30.6 ve su ekstreleri için ise % 48.6 olarak (Tablo 4.1) ve J.D. bitkisinin ekstrelerinin 1000 µg/mL derişimlerinin DPPH radikalini (100 µg/mL) giderme aktiviteleri ise eter ekstreleri için % 39.1, etanol ekstreler için % 50.03 ve su ekstreleri için ise % 51.42 olarak belirlendi (Tablo 4.1). Bu değerler H.R. ve J.D. bitkilerinin yapraklarından elde edilmiş su ekstrelerinin DPPH radikalini % 50 gibi önemli derecede giderdiklerini göstermektedir. Polarite arttıkça radikal giderme özelliğinin de arttığı gözlemlendi. Ayrıca J.D. eter ekstresinde H.R. eter ekstresine göre daha fazla radikal giderme özelliğinin bulunduğu gözlemlendi.

Bu farklılık ekstrelerin polar özelliklerinden ve bileşenlerinden kaynaklanmaktadır. Bazı araştırmacılar, örneklerin hidrofil/lipofil özelliklerinin radikal giderme aktivitelerine etki etmediğini göstermişlerdir.^{102,103} DPPH giderme aktivitesi başlıca olarak antioksidan bileşiklerin yapı özelliklerine bağlıdır. Önceden bu ekstrelerde fenolik bileşiklerin varlığı belirlendi. Yüksek radikal gidermenin de fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

100 µg/mL derişimde DPPH radikalinin 100 µg/mL derişimdeki α-tokoferol, askorbik asit ve BHA'nın sırasıyla % 83.4, % 93.8 ve % 95.1 aktivite gösterdiği belirlendi (Tablo 4.1). Literatür verilerine göre aynı derişimdeki DPPH ve α-tokoferol,

askorbik asit ve BHA'nın radikal giderme aktivitelerinin sırasıyla % 95.2, % 96.4 ve % 96.7 olmaktadır.⁶⁹ Standartların DPPH radikal giderme aktivitesi için elde edilen değerler literatür verileriyle uyum sağlamaktadır. Ancak serbest radikal giderme çalışmalarında DPPH derişimi oldukça önemlidir bu değerler çalışmalarda farklılık göstermektedir. Bu da standart bir kıyaslama yapmaya engel olmaktadır. DPPH derişimi % 0.0004 olan Shivapriya ve ark.'nın³³ çalışmasında H.R. bitkisinin hidro alkolik ekstrelerinin DPPH radikalini % 50 oranda inhibe eden derişim olan IC₅₀ değeri 70.92 µg/mL tespit edilmiştir. Bu çalışmada DPPH derişimi çalışmamıza göre 25 kat daha azdır. H.R. yaprak ekstrelerinde Yogendra Kumar ve ark.³⁴ tarafından yapılan başka bir DPPH (0.2mM) giderme çalışmasında ise 0.2 mg/mL ekstre derişiminde % 47.25 aktivite bulunmuştur. Bu değer bizim çalışma değerlerimize kıyasla (% 23.5-28.7) daha yüksektir. Varshneya ve ark.'nın³⁷ çalışmalarında H.R. bitkisi su-metanol ekstraktının DPPH (0.1mM) radikal gidermede IC₅₀ değeri 143.33 µg/mL tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki DPPH derişimi bizim çalışmamızdakinin 2/5'i kadardır. Ancak bizdeki H.R. bitkisinin su ve J.D. bitkisinin etanol ile su ekstrelerinin IC₅₀ değerleri ise yaklaşık 1mg/mL'dir. Literatürde J.D. bitkisinin kök ekstrelerinin DPPH radikal gidermede IC₅₀ değerleri metanol ve su ekstreleri için sırasıyla 1.1 µg/mL ve 10.3 µg/mL⁴⁸ ve J.D. metanol ve su ekstrelerinin serbest radikal gidermede IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.12 ve 0.898 mg/mL⁴² olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda DPPH derişimi belirtilmediğinden dolayı bizim çalışma ile kıyaslama yapılması zordur. Özellikle J.D. bitkisinin meyve kısımları ile ilgili DPPH serbest radikal giderme çalışmaları çok az olduğundan çalışmamızın her iki bitkinin meyve kısımlarının ekstraksiyon yönteminin de farklı olması nedeniyle çalışma sonucunun bu bitkiler için ileri çalışmalara yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Bitkilerin indirgeme kuvvetinin tayini Oyaizu yöntemi⁷⁸ kullanarak Fe^{3+} ün Fe^{2+} ye dönüşümünün değerlendirilmesi ile belirlendi. Bileşiklerin sergiledikleri indirgeme kuvveti değerleri, bunların elektron verme yeteneğinin bir ölçüsüdür.^{104,105} Bitki kaynaklı polifenolik bileşiklerin iyi elektron ve hidrojen atomu verici özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Bu sebepten de bitki ekstralerindeki polifenoller serbest radikal mekanizmalı zincir reaksiyonlarını sonlama veya yavaşlatma özelliklerine sahiptirler. Yen ve Duh¹⁰⁶, polifenoller içeren metanol ekstralarının indirgeme kuvvetleri ile antioksidan aktivite değerleri arasında uyumlu bir korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir. Diğer yönden Gordon¹⁰⁷ redükthanların serbest radikal zincirine hidrojen atomu vererek antioksidan aktivite gösterdiklerini belirtmiştir.

Bazı araştırmalarda da antioksidan aktivite ile belirli bitki ekstralarının indirgeme kuvvetleri arasında direkt bir ilişki olduğu gösterilmiştir.^{108,109} Bu sebepten de ekstraların antioksidan aktiviteleri bunların indirgeme kuvvetleri ile ilgili olabilir.

J.D. ve H.R. ekstraları BHT, askorbik asit ve α -tokoferolün derişime bağı olarak tayin edilmiş indirgeme kuvvetlerinin değerleri Tablo 4.2’de veridi. Ekstrelerin indirgeme kuvvetleri 1 mg/mL derişimde aşğıdaki sırayı takip etmektedir: J.D. bitkisinin eter (0.318) > H.R. bitkisinin su ekstresi (0.291) > J.D. bitkisinin su ekstresi (0.254) > J.D. bitkisinin etanol ekstresi (0.157) > H.R. bitkisinin eter ekstresi (0.154) > H.R. bitkisinin etanol ekstresi (0.109). Retinol, askorbik asit, α -tokoferol ve BHT 0.1 mg/mL derişimde sırasıyla 0.619, 0.484, 0.245 ve 0.153 indirgeme kuvvetini göstermektedir. J.D. bitkisinin eter ekstresi ile her iki bitkinin su ekstralarının 1 mg/mL’de daha yüksek indirgeme kuvveti gösterdiği gözlemlendi. Bu nedenle de test edilen bu ekstraların, elektron verme özelliğine sahip oldukları, serbest radikallerle etkileşerek onları daha stabil ürünlere dönüştürebildikleri ve radikal zincir reaksiyonunu sonlandırabilme yeteneklerine sahip oldukları söylenebilir.

Her iki bitki için de etanol ekstralarının düşük indirgeme kuvveti göstermesi ekstralarda yüksek miktar şekerlerin, ayrıca mono ve disakkaritlerin bulunmasından kaynaklanan prooksidant etkinin sonucu olabilir.¹¹⁰ Literatürde metillinoleat ve linoleik asidin sulu emülsiyon sistemlerinde pentoz, heksoz ve indirgen disakkaritlerin benzer kuvvetli prooksidant etki gösterdikleri de açıklanmıştır.¹¹¹⁻¹¹³

Diğer yönden klorofil bilindiği gibi bir fotosensitiserdir, triplet oksijeni singlet oksijene dönüştürme yeteneğine sahiptir ve bir prooksidant gibi etki gösterebilir ve de sonuçta ekstraların antioksidan kuvvetlerini düşürebilir.¹¹⁴

Daha önce belirtildiği gibi Hung ve ark.'nın⁴⁶ H.R. bitkisinin süperkritik karbondioksit ekstralarındaki indirgeme kuvveti sonuçları 0.42-8.32 mg/mL derişim aralığında 700 nm'de ölçüm yapılarak absorbans değerleri kaydedilmiştir. Absorbans değerleri ise 0.11-0.37 arasında değişmektedir. Çalışmamızdaki J.D. bitkisinin eter ve su ekstraları (0.118, 0.139) ile H.R. bitkisinin su ekstresi ise (0.146) değerleri göstermektedir. Bu değerler literatür değerlerden daha yüksektir. J.D. bitkisinin köklerinin ekstralarında yapılan bir araştırmada ise metanol ve su ekstralarının EC₅₀ yani 700 nm'deki absorbansının 0.5 olduğu belirtilmektedir. Bunlar da sırasıyla 72.0 ve 130.0 µg/mL değerlerdir ve bu değerler ise bizim çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerden yüksektir.⁴⁸ İndirgeme kuvveti çalışmalarında literatür verilerine göre H.R. bitkisi için çalışmamızda daha iyi sonuçlar elde ettik. Literatür taramasında J.D. bitkisinin meyve kısmı için az sayıda çalışmaya ulaşıldı. Bundan dolayı da çalışmamızın J.D. bitkisinin meyve kısmı için orijinal bir çalışma olduğu söylenebilir.

Metal iyonunu (Fe²⁺) kelatlama aktivitesinin belirlenmesinde sonuçlar % kelatlama olarak ifade edilmektedir. Ekstrelerin metal iyonlarını kelatlama aktivitesi antioksidan etkide önemli bir faktördür. Çünkü Fe²⁺ iyonları en etkili prooksidantlardır.¹¹⁵ Polifenoller demir gibi prooksidant özellik gösteren metal

iyonlarını kelatlayabilirler ve böylece prooksidantlardan kaynaklanan serbest redikal oluşumunu önlerler.¹¹⁶ Demir iyonları lipid peroksidasyonunu Fenton reaksiyonu aracılığı ile uyarabilir, aynı zamanda lipid peroksitlerini peroksil ve alkoksil radikallerine parçalamakla da lipid peroksidasyonunu hızlandırabilirler. Bu radikaller ise hidrojen alarak lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu geliştirebilirler.¹¹⁷ Ekstrelerin metal iyonunu kelatlama aktivitesi lipid peroksidasyonunda katalizör olarak etki gösteren geçiş metallerinin tutuklanmasını sağladıkları için oldukça önemlidir. Eser miktardaki metal iyonlarının bile oksidasyon sürecini hızlandığı bilinmektedir. Bu yüzden düşük kelatlama etkisi gösteren bileşiklerin de antioksidan aktivite oluşumunda önemi vardır.¹¹⁸⁻¹¹⁹

1 ve 5 mg/mL derişimlerdeki J.D. bitkisinin eter, etanol, su ekstrelerinin sırasıyla % 23.50-73.96, % 8.24-23.61 ve % 49.34-65.02 kelatlama etkisi gösterdiği tespit edildi. Aynı derişimlerde H.R. bitkisinin eter, etanol ve su ekstrelerinin ise sırasıyla % 6.53-22.31, % 13.56-56.68 ve % 35.4-42.81 aktivite gösterdiği belirlendi. Çalışmamızda standart metal kelatlayıcısı olarak EDTA kullanıldı. 1 mg/mL derişimde EDTA % 99.5 aktivite gösterdi. Bu sonuçlara bakıldığında J.D. bitkisinin eter ekstresinin % 73.96 oranında oldukça iyi ve su ekstresinin de % 65.02 oranında metal iyonu kelatladığı, ayrıca H.R. bitkisinin etanol ve su ekstrelerinin sırasıyla % 56.68 ve 42.81 oranında metal iyonu kelatladıkları görülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçların yeterliliğini ortaya koymak için daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştıracak olursak; Taviano ve ark.⁴⁹ J.D. bitkisinin metanol ve su ekstrelerinin metal iyonu kelatlamada IC₅₀ değerlerini sırasıyla 4.075 ve 1.004 mg/mL olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızdaki 2 mg/mL derişimde J.D. bitkisinin eter ve su ekstreleri sırasıyla % 52.45 ve 59.09 aktivite gösterdiği gözlemlendi. J.D. bitkisinin eter ekstresinin IC₅₀ değeri Taviano ve ark.'nın⁴⁹ çalıştığı değerden düşük fakat metal iyonu kelatlama aktivitesi yüksektir. Su ekstreleri

için elde edilen değerler birbirine yakındır. Hung ve ark.⁴⁶ yaptığı çalışmada H.R. bitkisinin çekirdek kısımlarının 0.92-18.3 mg/mL derişimlerinde sırasıyla metal iyonu kelatlama aktivitelerini % 7.74-38.50 olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise H.R. eter ekstresi hariç tüm değerler daha yüksektir (% 13.56-56.68). Chyau ve ark.²⁰ EDTA'nın kelatlama etkisinin 1 mg/mL derişimde % 99.5 olduğunu göstermişlerdir. Bu literatür verileri bizim metal iyonu kelatlama aktivite tayini sonuçlarımızın yüksek olduğunu göstermekte ayrıca her iki bitki içinde çalışma sayısı sınırlı olduğundan bu alandaki çalışmaların çeşitliliği açısından bizim çalışmamızın sonuçlarının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Fenolik bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir.¹²⁰ Fenolik bileşiklerin sebep olduğu etkenler besinlerin antioksidan özellikleri, besin değerleri ve renkleridir. Bitkilerdeki fenolik bileşikler antioksidan aktivite gösterirler ve serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif zararlara karşı hücreleri korurlar.¹²¹ Fenolik bileşiklerin ayrıca antimutajenik, antitümör ve antibakteriyel özelliklerinin olduğu da bilinmektedir.¹²² Önceki çalışmalar polifenolik bileşiklerin antioksidan aktivite ile uyum sağladıklarını ve lipidlerin oksidasyonunun stabilleşmesinde önemli role sahip olduklarını göstermiştir.¹⁰⁶ Bu nedenle de ekstrelerin antioksidan özelliklerinin nedenini açıklamak için bunların fenolik bileşiklere bağlı olup olmadıklarını belirlemek çok önemlidir.

Fenolik bileşik miktarı tayini ölçümlerinde sonuçlar eşdeğer miktar gallik asit olarak verilmiştir. Bunun için standart olan gallik asite ait derişim-absorbans grafiğinden yararlanıldı (Şekil 4.10). H.R. bitkisi ekstrelerinin fenolik bileşik miktarı sıralaması eter ekstreleri için 62.43 mg, su ekstreleri için 41.94 mg ve etanol ekstreleri için ise 18.94 mg olarak tespit edildi (Tablo 4.4). J.D. bitkisi ekstrelerinin gram başına eşdeğer mg miktar gallik asit olarak fenolik bileşik miktarı sıralaması ise eter ekstreleri

için 64.71 mg, su ekstraları için 34.74 mg ve etanol ekstraları için ise 30.35 mg olarak belirlendi (Tablo 4.4).

Varshneya ve ark.³⁷ çalışmalarında H.R. posasının ekstralarında fenolik bileşikler eşdeğer mg galik asit olarak belirlenmiş olup metanol, AME (70:30 su:metanol, h/h) ve su ekstraları için bu değerler sırasıyla 78.12, 84.28 ve 19.96 mg GAE/g ekstre olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda bu bitkinin su ekstresi değerinin daha yüksek (41.94) etanol ekstresi değerinin ise daha düşük (18.94) olduğu belirlendi. Thomas ve ark.⁴⁴ H.R. bitkisinin yaprak, çekirdek, kök ve dal kısımlarının sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen hekzan, etil asetat ve su ekstralarında ise fenolik bileşik miktarlarını 65 ± 14 ile 139 ± 22 mg GAE/g ekstre değerleri arasında belirlemiştir. Bu değerler çalışmamızdaki değerlerden daha yüksektir. J.D. bitkisinin köklerinde yapılan fenolik bileşik belirleme çalışmasında Tarık ve ark.⁴⁸ hekzan, metanol ve su ekstraktlarında sırasıyla 3.2, 76.1 ve 25.4 mg GAE/g ekstre bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise su ekstresi için fenolik bileşik miktarı değeri 34.74 ve apolar olan eter ekstresi değeri ise 64.71 olarak tespit edildi ve daha yüksek değere sahiptir. Bunun nedeni araştırılan bitki kısımlarının farklı olması ya da bulunduğu coğrafi koşulların farklılığıdır.

Çalışmamızda karaciğer toksisitesi oluşturulduktan sonra H.D. ve J.R. bitkisi verilen ratların karaciğer dokularında UV ve floresans dedektörlü HPLC yöntemleriyle retinol ve α -tokoferolün miktar tayinleri gerçekleştirildi. Literatür taramasında dokuda eş zamanlı miktar tayinleri ile ilgili çalışmalara ulaşamadık. Ancak bu bitkilerle ilgili olarak serum ve plazma çalışmaları mevcuttur. Wisanu⁵² yaptığı çalışmada avokado bitkisinin su:hekzan (50:50) ekstresinde UV-HPLC yöntemiyle gradient hareketli faz metanol:su kullanarak retinol ve α -tokoferolü analiz etmiştir. Retinol ve α -tokoferol için sırasıyla LOD değerleri; 0.044 ve 0.134 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ değerlerini ise

sırasıyla 0.120 ve 0.364 µg/mL olarak tespit etmiştir. Bu çalışmada ise retinol ve α-tokoferol için sırasıyla LOD değerleri 0.025 ve 0.220 µg/mL ve LOQ değerleri ise 0.100 ve 0.712 µg/mL olarak belirlendi. Bu değerler bizim çalışmamıza yakındır. Analiz süresi 5.5 dk'dır bizim çalışmamızdaki analiz süresi ise 5 dk'dır. Kesinlik değeri retinol için gün içi; 1.04-1.90 günler arası; 1.05-1.33 arasında α-tokoferol için ise gün içi; 1.07-1.80 günler arası; 1.00-1.02 arasındadır. Bizim çalışmamızda ise retinol için günüçi:1.112-1.464 arasında günler arası; 0.070-3.037 arasında α-tokoferol için ise gün içi:0.027-0.140 arasında günler arası; 0.070-0.822 olduğu belirlendi. Geri kazanım olarak ise retinol için % 103.84-114.66 α-tokoferol için ise % 97.27-106.16 aralığındadır. Bizim çalışmamızda ise retinol için % 97.667-104.800 ve α-tokoferol için % 93.933-104.173 aralığındadır. Çalışmada internal standart kullanılmamıştır. Başka bir çalışmada William ve ark.⁷⁰ serumdan α-tokoferol ve retinolü UV ve amperometrik dedektörlü LC yöntemiyle analiz etmişlerdir. İnternal standart olarak tokol kullanmışlar ve gradient hareketli faz ile çalışmışlardır. Ekstraksiyonda ise sıvı-sıvı hekzan ekstraksiyonunu yapmışlardır. Bu yönden çalışmalar birbirine benzerlik göstermektedir. Retinol ve α-tokoferol için LOQ değerleri 6 ve 96 µg/mL'dir. LOD değerleri ise 1.3 ve 16 µg/mL'dir. Analiz süresi hızlı izokratik elüsyonda 15 dk yavaş gradient elüsyonda ise 30 dk'dır. Çalışmada kesinlik ve doğruluk değerleri verilmemiştir. Bizim çalışmamız analiz süresi olarak daha kısadır. Retinol ve α-tokoferol için sırasıyla LOD değerlerimiz; 0.400 ve 0.670 ve LOQ değerlerimiz ise 1.232 ve 1.964 µg/mL'dir ve bu çalışmaya göre daha düşük ve hassasiyeti daha fazladır. Ganière-Monteil ve ark.⁵⁴ ise çalışmalarında retinol ve α-tokoferolün plazmadan analizini gerçekleştirmişlerdir. Hekzan ile sıvı sıvı ekstraksiyonu yapmışlardır. HPLC sisteminde ise izokratik hareketli faz asetonitril:metanol:su (64.5:33:2.5, h/h/h) kullanmışlar analiz süreleri ise 8 dk'dır. Çalışmalarında geri kazanım % 100'dür. 280 nm'de UV dedektör kullanmışlardır. LOD

değerleri retinol ve α -tokoferol için sırasıyla 0.015 $\mu\text{g/mL}$ ve 0.030 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Bizim çalışmamızdaki geri kazanım değerleri retinol için % 97.667-104.800 ve tokoferol için % 96.800-104.173 aralığındadır ve bu çalışmaya eş değerdedir. Retinol ve α -tokoferol için sırasıyla LOD değerleri 0.400 ve 0.670 $\mu\text{g/mL}$ olup ve bu literatürdeki değere yakındır. Thongchai ve Liawruangrath⁵⁵ çalışmalarında nano emülsiyon mısırozü yağında retinol ve α -tokoferol eş zamanlı analizini gerçekleştirmişlerdir. C_8 (4.6 mm $\times$ 150 mm) kolon ile metanol:su hareketli fazı ve gradient elüsyon kullanmışlardır. Analiz süresi 15 dk'dır. Bizim çalışmamızın analiz süresi bu yöntemle göre daha kısadır. retinol ve α -tokoferol için LOD değerleri sırasıyla 0.063 ve 0.067 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ değerleri ise 0.192 ve 0.203 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Çalışmamızda retinol ve α -tokoferol için sırasıyla LOD değerleri; 0.025 ve 0.220 ve LOQ değerleri ise 0.100 ve 0.712 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Bizim çalışmamız retinol için daha yüksek hassasiyete sahiptir. α -Tokoferol için ise bu yöntemle göre daha düşük hassasiyete sahiptir. Retinolün gün içi kesinlik değerleri derişimler için sırasıyla 2.34-1.81-1.48 ve günler arası: 2.02-1.00-1.01'dir. α -Tokoferolün günüçi kesinlik değerleri derişimler için (5-10-20 $\mu\text{g/mL}$) sırasıyla 2.16-1.36-1.94 ve günler arası: 2.05-1.21-1.33'tür. Bizim çalışmamızda ise retinol için gün içi 1.112-1.464 arasında ve günler arası ise 0.070-3.037 arasında tokoferol için ise gün içi 0.027-0.140 arasında günler arası ise 0.070-0.822 olarak belirlendi. Bu veriler de bize gösteriyor ki bizim çalışmamızın kesinlik değerleri daha iyidir.

DPPH radikali proton alarak tutuklanacağından radikal giderme aktivitesi proton vermenin bir ölçüsüdür. Fenolik bileşikler kolaylıkla hidroksil hidrojenini verebilirler. Çünkü fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arasındaki bağ, oluşacak fenol radikalının rezonans kararlılığından dolayı kolaylıkla homolitik olarak parçalanabilir ve böylece üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen kolaylıkla verilebilir. Bu yüzden fenolik bileşik miktarı ve radikal giderme aktivitesi birbiriyle ilişkilidir. Bu etanol ve su

ekstreleri için sonuçlardan anlaşılmaktadır ($P<0.05$). Ancak eter ekstreleri her iki bitki için de etanol ve su ekstrelerinden daha fazla fenolik bileşik içermektedir. Ayrıca indirgeme kuvveti de proton verme yeteneğine bağlı olduğundan radikal giderme aktivitesi ve indirgeme kuvveti arasında da bir ilişki olacağı düşünülebilir. Bu yüzden bitki ekstreleri için fenolik bileşik miktarı tayini ölçümü, indirgeme kuvveti ve radikal giderme aktivite ölçümleri arasındaki ilişkiye bakılmalıdır. Her iki bitki ekstrelerinde radikal giderme, indirgeme kuvveti ve fenolik bileşik miktarları arasında bir ilişki olduğu görülmektedir ($P<0.05$). J.D. bitki ekstrelerinde metal iyonu kelatlama, indirgeme kuvveti ve fenolik bileşik miktarları arasında Eter Ekstresi > Su Ekstresi > Etanol Ekstresi şeklinde bir ilişki olduğu görülmektedir ($P<0.05$). J.D. bitkisi eter ekstresi için sıçanlara uygulanan ve karaciğer toksisitesi sonucunda biyokimyasal ölçümleri alınan AST ve ALT seviyelerinde diğer gruplara göre oldukça iyi olduğu gözükmemektedir (Sırasıyla 883, 215). Ayrıca H.R. su ekstresi de J.D. eter ekstresine yakın değerlerde AST ve ALT değerlerine (sırasıyla 1002, 318) sahiptir ve bu indirgeme kuvveti ile ilişkilidir ($P<0.05$).

Antioksidan bileşik olarak bilinen α - tokoferol ve retinol için hayvan gruplarından alınan doku örneklerinde HPLC analizleri yapıldığında H.R. su ekstresi verilen hasarlı hayvan grubu dokularında retinol miktarının tespit edildiği, bu değer (2.651 μg) kontrol değerinden (9.125 μg) küçük olduğu tespit edildi.

α -Tokoferol miktarı hasarlı dokuların hiçbirinde ölçülemediğinden hasar sonucunda dokularda α -tokoferol azalması olduğu kanısına varılmaktadır. Hayvan doku çalışmalarında floresans dedektörlü ölçümlerde α -tokoferolün daha düşük miktarlarda ölçülebildiği (daha düşük LOQ değeri) retinolün ise aynı şekilde UV dedektörle düşük miktarlarının ölçülebildiği (daha düşük LOQ değeri) tespit edildi ve bu çalışmanın her iki dedektörle gerçekleştirilmesi bir avantaj olduğunun kanısına varıldı.

Genelde bitkilerden elde edilen antioksidan bileşikler polar bileşiklerdir (flavonoidler, fenolik asitler, antosiyaninler, tanenler rozmarik asit, vs). Apolar özellikli doğal antioksidan kaynaklarına çok az rastlanmaktadır. Çalışmalarımızın sonucu göstermektedir ki, özellikle andız bitkisi hem lipofil ve hem de hidrofil özellikli antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin kaynağı olabilir. Bu da çalışmanın bir avantajı olarak gösterilebilir.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; H.R. (*Hippophae Rhamnoides*) ve J.D. (*Juniperus Drupacea*) bitkilerinin belirli derecede antioksidan aktivite gösterdikleri, özellikle andız eter ve çalı gagası su ekstratlarının karaciğer hasarında etkili oldukları, antioksidan oldukları bilinen ve karaciğer dokularında bulunan α - tokoferol ve retinolün UV ve floresans dedektörlü HPLC yöntemiyle kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılabileceği, bu analizlerde hareketli faz bileşenlerinin HPLC sistemine olumsuz bir etkisinin olmadığı, analiz süresinin 5 dk gibi kısa bir süre olmasından dolayı zaman ve maddenin ekonomik kullanımını sağlayacağı gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların farklı doğal antioksidan çalışmalarına, karaciğer toksisitesinde vitaminlerin etkisi ile ilgili çalışmalara, α - tokoferol ve retinolün dokudan eş zamanlı floresans dedektörlü HPLC yöntemiyle analizini gerçekleştiren hassasiyeti yüksek orijinal bir çalışma olmasından dolayı doku ve farmasötik preparatlardan α - tokoferol ve retinol analizi gerektiren çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda çalışılan her iki bitkinin antioksidan özelliğe sahip olduğu ve karaciğer hasarında iyileştirme etkisinin olduğu görülmektedir. Bu bilgiler ışığında daha ileri çalışmaların aktivite yönünden değerlendirilmesinin de yapılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Baytop A. *Farmasotik Botanik Ders Kitabı*, 5. Baskı. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 1991:180-181.
2. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1990, 29:273-300.
3. Jung HA, Park JC, Chung HY, Kim J, Choi JS. Antioxidant flavanoids and chlorogenic acid from the leaves of *eriobotrya japonica*. *Arch Pharm Res*, 1999, 22:213-218.
4. Pietta P, Simonetti P, Mauri P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J Agr Food Chem*, 1998, 46:4487-4490.
5. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *J Agr Food Chem*, 2002, 50:4989-4993.
6. Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanism in carcinogenesis. *Br Med Bull*, 1993, 49:523-544.
7. Duh PD, Yen GC. Antioxidative activity of three herbal water extracts. *Food Chem*, 1997, 60:639-645.
8. Duthie GG, Wahle KWJ, James WPT. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr Res Rev*, 1989, 2:51-62.
9. Lee SK, Mbwambo ZH, Chung H. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb Chem High T Scr*, 1998, 1:35-46.
10. Robinson EE, Maxwell SR, Thorpe GH. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radic Res*, 1997, 26:291-302.

11. Madavi DL, Salunkhe DK. Toxicological aspects of food antioxidants. In: Madavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK (eds). *Food Antioxidants*, 3th ed. New York, Marcel Dekker Inc, 1995:267.
12. Loliger J. The antioxidants in foods. In: Auroma IO, Halliwell B (eds). *Free Radical and Food Additives*, 2nd ed. London, Taylor&Francis Ltd, 1991:121.
13. Lagouri V, Boskov D. Nutrient antioxidants in oregano. *Int J Food Sci Nutr*, 1996, 47:493-497.
14. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 1996, 16:33-50.
15. Arnao MB, Cano A, Acosta M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. *Free Radical Res*, 1999, 31:589-596.
16. Baytop T. *Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi Geçmişte ve Bugün*, 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 1999:420.
17. University of California. Calphotos. http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0311+0619. 12Eylül 2017.
18. Zeb A. Chemical and nutritional constituents of sea buckthorn juice. *J Nutr*, 2004, 3:99-106.
19. T.C. Orman Genel Müdürlüğü Afyonkarahisar Tıbbi ve İtri Bitkiler Merkezi. Andız (Juniperus drupacea) <http://atib.ogm.gov.tr/Sayfalar/T%C4%B1bbi%20ve%20İtri%20Bitkilerimizi%20Tan%C4%B1yal%C4%B1m/Andiz.aspx>. 28 Haziran 2016.
20. Frankel EN, Meyer AS. The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric*, 2000, 80:1925-1941.

21. Guntensperger B, Hammerli-Meier DE, Escher FE. Rosemary extract and precooking effects on lipid oxidation in heatsterilized meat. *J Food Sci*, 1998, 63:955-957.
22. Kings U, El-Saharty YS, El-Zeany B, Pabel B, Berger R F. Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ. *Food Chem*, 2000, 71:91-95.
23. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE Free radicals, antioxidants and human disease: Where Are We Now. *J Lab Clin Med*, 1992, 119:598-620.
24. Foo LY, Porter LJ. The structure of tannins of some edible fruits. *J Sci Food Agric*, 1981, 32:711-716.
25. Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Pytochemistry*, 1988, 27:969-978.
26. Aruoma OI, Cuppett SL. *Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concept*, 4th ed. Champaign, Illions, AOCS Pres, 1997:241.
27. Endo Y, Usuki R, Kareda T. Antioxidant effects on chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark II. *J Am Oil Chem Soc*, 1985, 62:1387-1390.
28. Ingold KU. Inhibition of autoxidation. *Adv Chem Ser*, 1968, 75:296-305.
29. Gordon MH. The mechanism of the antioxidant action in vitro. In: B. J. F. Hudson (Ed.), *Food Antioxidants*, 3th ed. London/New York, Elsevier.1990:1-18.
30. Górnas P, Šnē E, Siger A, Segliņa D. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) vegetative parts as an unconventional source of lipophilic antioxidants. *Saudi J Biol Sci*, 2016, 23:512-516.
31. Diandong H, Feng G, Zaifu L, Helland T, Weixin F, Liping C. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) oil protects against chronic stress-induced inhibitory

- function of natural killer cells in rats. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2016, 29:76-83.
32. Song C, Du J, Ge H. Research of Hippophae rhamnoides fruits on serum lipids and liver protection effects in high-fat-diet rats. *J Hyg Res*, 2015, 22:645-650.
 33. Shivapriya S, Ilango K, Dubey GP. Evaluation of antioxidant and neuroprotective effect of Hippophae rhamnoides (L.) on oxidative stress induced cytotoxicity in human neural cell line IMR32. *Saudi J Biol Sci*, 2015, 22:645-650.
 34. Saeidi K, Alirezalu A, Akbari Z. Evaluation of chemical constitute, fatty acids and antioxidant activity of the fruit and seed of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) *Nat Prod Res*, 2016, 30:366-368.
 35. Yogendra Kumar MS, Tirpude RJ, Maheshwari DT, Bansal A, Misra K. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves in vitro. *Food Chem*, 2013, 141:3443-3450.
 36. Kruczek M, Swiderski A, Mech-Nowak A, Król K. Antioxidant capacity of crude extracts containing carotenoids from the berries of various cultivars of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*). *Acta Biochim Pol*, 2012, 59:135-137.
 37. Varshneya C, Kant V, Mehta M. Total phenolic contents and free radical scavenging activities of different extracts of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) pomace without seeds. *Int J Food Sci Nutr*, 2012, 63:153-159.
 38. Maheshwari DT, Yogendra Kumar MS, Verma SK, Singh VK, Singh SN. Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) leaves. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49:2422-2428.

39. Hsu YW, Tsai CF, Chen WK, Lu FJ. Protective effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47:2281-2288.
40. Chauhan AS, Negi PS, Ramteke RS. Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds. *Fitoterapia*, 2007, 78:590-592.
41. Sakar MK, Friedrich H. Flavonoids in the leaves of *Juniperus drupacea*. *Planta Med*, 1984, 50:108-109.
42. Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghier V, La Barbera TM, Güvenç A, Hürkul MM, Pasquale RD, Miceli N. Antioxidant and antimicrobial activities of branches extracts of five *Juniperus* species from Turkey. *Pharm Biol*, 2011, 49:1014-1022.
43. Güvenç A, Küçükboyacı N, Gören AC. Fatty acid composition of *Juniperus* species (*Juniperus section*) native to Turkey. *Nat Prod Commun*, 2012, 7:919-922.
44. Thomas M, Emilie D, Gaëtan Le F, Marie Elisabeth L, Claire E. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chem*, 2012, 131:754-760.
45. Thomas M, Emilie D, Claire E. Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. *Food Chem*, 2011, 126:1380-1386.
46. Hung-Chih T, Yu-Wen H, Chia-Fang T, Fung-Jou L, Ming-Chih C, Wen-Kang C. The in vitro and in vivo antioxidant properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil. *Food Chem*, 2011, 125:652-659.

47. Yogendra K, Ruma D, Dipti P, Kshipra M. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chem*, 2011, 127: 1309-1316.
48. Tarik Mohammed C, Farah H, Fouzia AB, Riadh K, Rachid A, Zahia B, Choukri T, Romain L. Antioxidant, haemolytic activities and HPLC–DAD–ESI–MSⁿ characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Ind Crops Prod*, 2015, 64:182-187.
49. Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Güvenç A, Pasquale RD, Miceli N. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58:22-29.
50. Marija ML, Ivana NB, Dejan ZO, Goran TA, Kristina JB, Marina MF, Neda MMD. *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chem*, 2011, 124:850-856.
51. Lucia P, Minerva P, Iuksel R, Alice G, Corina B. *Hippophae rhamnoides* L. as source of active ingredients for biopharmaceutical engineering. *Agric Agric Sci Proc*, 2015, 6:593-600.
52. Wisanu T. Determination of retinol and alpha-tocopherol in avocado nanoemulsion with monolithic column. *T J Pharm Sci*, 2014, 38:1-56.
53. William AM, Emil S. Determination of Retinol, α -Tocopherol, and p-Carotene in Serum by Liquid Chromatography with Absorbance and Electrochemical Detection. *Clin Chem*, 1987, 33:1585-1592.

54. Ganière-Monteil C, Kergueris MF, Pineau A, Blanchard B, Azoulay C, Larousse C. Determination of plasma retinol and alpha-tocopherol by HPLC. *Ann Biol Clin*, 1994, 52:547-553.
55. Thongchai W, Liawruangrath B. Development of HPLC analysis for the determination of retinol and alpha tocopherol in corn oil nanoemulsion lotion. *Food Res Int*, 2016, 23:1367-1371.
56. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*, 6. Baskı. Ankara, Gazi Kitapevi, 2002:101-1273.
57. Skoog DA, Leary JJ. *Principles of Instrumental Analysis*, 4th Ed. New York. Harcourt Brace College Publishers, 1998:116-706.
58. Atila A. Bazı non steroidal antiinflamatuvar ilaçların ratlarda oral uygulama sonrası kan adrenalın düzeyleri üzerine etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2011.
59. Wiberg K. Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. www.anchem.su.se/downloads/diss.pdf 2004. 20.12.2013.
60. Demirkaya F. A, E ve K vitaminlerinin farmasötik preparatlarda, insan plazmasında ve tavşan plazmasında farklı analitik yöntemlerle miktar analizi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2009.
61. Analitik Kimya II Laboratuvar Aletli Analiz Deneyleri, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2005.
62. Skoog DA, Holler FJ, Timothy AN. Principles of Instrumental Analysis. Çeviri: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. *Enstrümental Analiz İlkeleri*, 5. Baskı. Ankara, Bilim Yayıncılık, 1998, 299-777.

63. Ragnarsson JO, Labuza TP. Accelerated shelf-life testing for antioxidative rancidity in foods – a review. *Food Chem*, 1977, 2:291-308.
64. Khal R, Hilderbrant AG. Methodology for studying antioxidant activity and mechanism of action of antioxidants. *Food Chem Toxicol*, 1986, 24:1007-1014.
65. Frankel EN. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability of food lipids. *Trend Food Sci Technol*, 1993, 4:220-225.
66. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 1999, 66:401-436.
67. Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, Hunez MJ, Parajo JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 2001, 72:145-171.
68. Koleva II, Wan Beek TA, Linssen JPH, De Groot A, Evstatieva LN. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem Anal*, 2002, 13:8-17.
69. Chyau CC, Tsai SY, Ko PT, Mau JL. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Chem*, 2002, 78:483-488.
70. Mau JL, Huang PN, Huang SJ, Chen CC. Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. *Food Chem*, 2004, 86:25-31.
71. Yen GC, Duh PD, Tsaia HL. Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem*, 2002, 79:307-313.
72. Oktay M, Gülçin İ, Küfrevioğlu Öİ. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *U-Technol*, 2003, 36:263-271.

73. Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *J Am Oil Chem Soc*, 2000, 77:957-961.
74. Duh PD, Tu YY, Yen GC. Antioxidant activity of water extract of Harug Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lwt-Food Sci Technol*, 1999, 32:269-277.
75. Chang LW, Yen WJ, Huang SC, Duh PD. Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chem*, 2002, 78:347-354.
76. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol*, 1995, 28:25-30.
77. Santiago LA, Hiramatsu M, Mori A. Japanese soybean paste miso scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1992, 38:297-304.
78. Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang T, Ho C. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem*, 1998, 46:4869-4873.
79. Pellegrini N, Simonetti P, Gardana C, Brenna O, Brighenti F, Pietta P. Polyphenol content and total antioxidant activity of Vini Novelli (Young Red Wines). *J Agric Food Chem*, 2000, 48:732-735.
80. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner AA. Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 1993, 84:407-412.
81. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lwt-Food Sci Technol*, 1995, 28:25-30.
82. Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A, et al. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem*, 1999, 47:1035-1040.

83. Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura –Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*, 1998, 76:270-276.
84. Yen CC, Duh PD. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *J Am Oil Chem Soc*, 1993, 70:383-386.
85. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using PPPH. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62:1201-1204.
86. Hatono T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavanoids and other costituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull*, 1998, 36:1090-207.
87. Bran-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lwt-Food Sci Technol*, 1995, 28:25-30.
88. Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activty of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem*, 2004, 84:551-562.
89. Singh N, Rajini PS. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem*, 2004, 85:611-616.
90. Tanaka M, Kuie CW, Nagashima Y, Taguchi T. Applications of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakk*, 1988, 54:1409-1414.
91. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem*, 1992, 40:945-948.
92. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction preperad from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 1986, 44:307-315.

93. Dinis TCP, Maderia VMC, Akmeida LM. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salycilate and 5-aminosalycilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315:161-169.
94. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Ravenros RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Met Enzymol*, 1999, 299:152-178.
95. Karatas F, Kamisli F. Variations of vitamins (A, C and E) and MDA in apricots dried in IR and microwave. *J Food Eng*, 2007, 78:662-668.
96. Chen CW, Ho CT. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black tea. *J Food Lipids*, 1995, 2:35-46.
97. Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem*, 1997, 60:73-77.
98. Rapisarda P, Tomaino A, Lo Cascio R, Bonina F, De Pasquale A, Saija A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J Agric Food Chem*, 1999, 47:4718-4723.
99. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 1999, 26:1231-1237.
100. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium health. *Int J Food Sci Tech*, 2001, 36:703-725.
101. Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng CY. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activity of yam sours as affected by different drying methods. *Food Chem*, 2003, 83:85-92.

102. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62:1201-1204.
103. Pekkarinen SS, Stockmann H, Schwarz K, Heinonen, M, Hopia, AI. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J Agric Food Chem*, 1999, 47:3036-3043.
104. Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ. Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem*, 2003, 83:255-262.
105. Yıldırım A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur ÖF, Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf. Ex. D.C.), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis* L.) extracts. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:5030-5034.
106. Yen GC, Duh PD, Tsai CL. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. *J Agric Food Chem*, 1993, 41:67-70.
107. Gordon MH. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: Hudson BJF (ed). *Food antioxidants*, 1th ed. London, Elsevier Applied Science, 1990:1-18.
108. Duh PD, Du PC, Yen GC. Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37:1055-1061.
109. Duh PD. Antioxidant activity of burdock (*Arctiumlappa Linne*): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, 75:455-461.
110. Barthakur NN, Arnold NP, Alli I. The Indian laburnum (*Cassia fistula* L.) fruit: an analysis of its chemical constituents. *Plant Food Hum Nutr*, 1995, 47:55-62.

111. Mabrouk AF. The kinetics of methyl linoleate emulsion autoxidation in the presence of polyhydroxy compounds. *J Am Oil Chem Soc*, 1964, 41:331-334.
112. Yamaguchi N, Yamada A. Studies on antioxidative activity of brown sugar. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakk*, 1981, 28:303-308.
113. Yamaguchi R, Goto Y, Kato K, Ueno Y. Prooxidant effects of dihydroxyacetone and reducing sugars on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions. *Agric Biol Chem*, 1994, 48:843-848.
114. Korycka-Dahl MB, Richardson T. Activated oxygen species and oxidation of food constituents. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1978, 10:209-241.
115. Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng CY. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activity of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chem*, 2003, 83:85-92.
116. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*, 2002, 113:71-88.
117. Halliwell B. The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species. In: Aruoma OI, Halliwell B.(eds). *Free Radicals and Food Additives*. 2nd ed. London, Taylor&Francis Ltd, 1991:37-57.
118. Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimira Y, Nakazawa H. Antioxidant and anti-glycation of carinol from *garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:180-185.
119. Bhandari MR, Kawabata J. Organic acid, phenolic content and antioxidant activity of wild yam (*Dioscorea spp.*) tubers of Nepal. *Food Chem*, 2004, 88:163-168.
120. Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:2866-2887.

121. Maga JA. Simple phenol and phenolic compounds in food flavour. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1978, 10:323-372.
122. Shui G, Leong LP. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by HPLC. *J Chromatogr A*, 2002, 977:89-96.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Metin ÇAPA
Doğum tarihi: 24.08.1979
Doğum yeri: Osmancık
Medeni hali: Evli
Uyruğu: T.C.
Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Tel: 05057975305
Faks: 04422315201
E-mail: mehtametin@mynet.com
Eğitim
Lise: Osmancık Lisesi (1996)
Lisans: Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (1996-2000)
Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2001-2005)
Doktora: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2005-2017)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce (ÜDS 50.00, Mart 2004)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
-
İlgi Alanları ve Hobiler
Otomobil sporları

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : B.30.2.ATA.0.23.85-126
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

18.11.2008
ERZURUM

Sayın Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU
Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 17.09.2008 tarihli yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, tarafınızca Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülecek olan “*Hippophae Rhamnoid* (Çalı Gagası), *Citrus Nobilus* (Mandarin), *Citrus Limonium* (Limon) ve *Arcethos andrachne* (Andız) bitkilerinin çeşitli ekstrelerinin karaciğer toksisitesi ve antioksidant enzimler üzerine etkileri ve aktivitelerinin araştırılması” başlıklı araştırma çalışmanız, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 06.11.2008 tarih ve 10 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 74 no’lu kararı ile araştırmanın Etik Kurallara uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Doç.Dr.Mustafa ATASEVER
Başkan

Toplantı Tarihi : 06.11.2008

Toplantı Sayısı : 10

KARAR NO : 74- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU’nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülecek olan “*Hippophae Rhamnoid* (Çalı Gagası), *Citrus Nobilus* (Mandarin), *Citrus Limonium* (Limon) ve *Arcethos andrachne* (Andız) bitkilerinin çeşitli ekstrelerinin karaciğer toksisitesi ve antioksidant enzimler üzerine etkileri ve aktivitelerinin araştırılması” başlıklı araştırma çalışması ile ilgili proje yürütücüsü Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU’nun 17.09.2008 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; (Yönergenin 5/f maddesi gereğince, Yrd.Doç.Dr.Mine GÜLABOĞLU oylamaya katılmadı), karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, 25700-Aziziye/ERZURUM

Telefon : 0-442-631 41 93 – 631 41 96 Fax : 0-442-631 41 88 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr



EK-3. ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



SAYI : 2036991/68.00- 322

KONU : Tez Konusu Hk.

11 TEM 2014

Sayın: Metin ÇAPA
Eczacılık Analitik Kimya Ana Bilim Dalı

Tez isminin değiştirilmesine ilişkin Enstitümüz Yönetim Kurulu'nun almış olduğu 10.07.2014 tarih ve "2014.27.2" sayılı kararı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
MÜDÜR

EK: 1 Adet Karar

e-mail:sagbilenst@atauni.edu.tr
Harici Tlf : 0 442 - 236 09 70

Dahili Tlf : 0-442-231-4885-4886-4887-4895
Fax : 0-442 - 236 09 69

“2014.27.2” ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI OTURUM TARİHİ 10.07.2014

2- Enstitümüz Eczacılık Analitik Kimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Metin ÇAPA'nın tez isminin değiştirilmesine ilişkin Anabilim Dalı Başkanlığının 10.07.2014 tarih ve 111 sayılı yazısı görüldü

Yapılan görüşmelerde Metin ÇAPA'nın tez konusunun içeriği değişmeksizin Anabilim Dalı Başkanlığınca teklif edildiği şekli ile **“Hippophae Rhamnoid (Çalı Gagası) ve Juniperus Drupacea (Andız) Bitkilerinin Çeşitli Ekstrelerinin Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması”** olarak değiştirilmesine, kararın öğrenciye ve Anabilim Dalı Başkanlığına bildirilmesine mevcudun oy birliği ile;

MÜDÜR

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

MÜDÜR YRD.

Prof. Dr. Abdulkadir YILDIRIM

MÜDÜR YRD.

Doç. Dr. Reva BALCI AKPINAR

ÜYE

Prof. Dr. Mehtap TAN
(Katılmadı)

ÜYE

Prof. Dr. Hayati Murat AKGÜL

ÜYE

Doç. Dr. Meltem ÇETİN

Hilmi DİYARBAKIR
Enstitü Sekreteri (Raporlar)



EK-4. DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI (Tez başlığı değişiklik önerisi olanlar için) (FORM: 22)

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı ve Soyadı : Mehmet ÇAPA Danışmanı : Prof. Dr. Yusef KARAOĞLU
Programı (Fakülte/Y.Okul) : Eczacılık Fakültesi Ortak Danışman :
Anabilim Dalı : Analitik Kimya

Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06/12/2017 ve
46-06 sayılı kararıyla oluşturulan tez savunma sınavı jürisi,
Hippocras Rhomneia (Çalı, Gaganı) ve Juniperus Drupacea (Andan) Bittulorin
Gıvilli Elektrolerinin Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılması
başlıklı **doktora tezini** incelemiş ve aday 18/12/2017 tarihinde, saat 15.00'da tez
savunma sınavına tabi tutmuştur.

DEĞERLENDİRME VE SONUÇ:

- ☒ Jüri raporlarının tartışılması sonucunda **başarıyla** savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE**,
☐ Jüri raporlarının tartışılması sonucunda, ay ek süre verilerek tezin **DÜZELTİLMESİNE**,
☐ Jüri raporlarının tartışılması sonucunda tezin **REDDEDİLMESİNE**,
☒ ancak **konu ve içeriği değişmeksizin** tez başlığının Hippocras Rhomneia (Çalı, Gaganı)
ve Juniperus Drupacea (Andan) Bittulorin Gıvilli Elektrolerinin Antibakteriyel
Aktivite ve Analizlerinin Araştırılması olarak düzenlenmesine,

☒ OY BİRLİĞİ

☐ OY ÇOKLUĞU ile karar verilmiştir.

Tez Sınav Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	<u>Prof. Dr. Bekir BATI</u>	
Üye	<u>Prof. Dr. Sedat KIR</u>	
Üye	<u>Prof. Dr. Mine Gülaboğlu</u>	
Üye	<u>Prof. Dr. Zeki Halkı</u>	
Üye	<u>Prof. Dr. Lücel Kadioğlu</u>	
Üye		
Üye		