

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

KUZEYDOĞU ANADOLU KÖKENLİ BAZI YENİLEBİLİR BİTKİ
EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTE VE FENOLİK ASİT PROFİL
DEĞİŞİMİNİN EKSTRAKSİYON TEKNİĞİ TABANLI İNCELENMESİ

İnan DURSUN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr. Fikret AKDENİZ

TEMMUZ-2020

KARS



T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI



**KUZEYDOĞU ANADOLU KÖKENLİ BAZI YENİLEBİLİR BİTKİ
EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTE VE FENOLİK ASİT PROFİL
DEĞİŞİMİNİN EKSTRAKSİYON TEKNİĞİ TABANLI İNCELENMESİ**

İnan DURSUN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. Fikret AKDENİZ

TEMMUZ-2020

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
Doktora öğrencisi İnan DURSUN'un Prof.Dr.Fikret AKDENİZ'in danışmanlığında
Doktora tezi olarak hazırladığı "Kuzeydoğu Anadolu Kökenli Bazı Yenilebilir Bitki
Ekstraktlarının Biyolojik Aktivite ve Fenolik Asit Profil Değişiminin Ekstraksiyon
Tekniği Tabanlı İncelenmesi" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri
tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy
. ile kabuledilmiştir.

.. / .. / 20..

AdıveSoyadı

İmza

Başkan : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Prof. Dr. Atila ÇAĞLAR

Üye : Prof. Dr. Fikret AKDENİZ

Üye : Dr. Öğr. Üy. Füreyâ Elif ÖZBEK

Üye : Dr. Öğr. Üy. Zafer OCAK

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. / .. / 20. .gün ve ...
.../. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Fikret AKDENİZ

Enstitü Müdürü V.

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallarçerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygunolarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynaktgösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değışiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İnan DURSUN

16.07.2020

ÖZET

(Doktora Tezi)

KUZEYDOĞU ANADOLU KÖKENLİ BAZI YENİLEBİLİR BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTE VE FENOLİK ASİT PROFİL DEĞİŞİMİNİN EKSTRAKSİYON TEKNİĞİ TABANLI İNCELENMESİ

İnan DURSUN

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fikret AKDENİZ

Bu doktora tez çalışmasında Kuzey Anadolu kökenli yenilebilir bitkilerden *Amaranthus retroflexus* L. (AR), *Echinops viscosus* DC. subsp. *bithynicus* (Boiss.) Rech f.(EV), *Lathyrus tuberosus* L. (LT), *Chenopodium foliosum* Asch. (CF), *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent (CP)'nin toprak üstü kısımlarının havada ve liyofilizatörde kurutulmuş numunelerinin (parçacık boyutu 125 µm'den küçük kısımları) ekstraksiyonları gerçekleştirildi. Soxhlet ekstraksiyonu (SE) tekniğinde etanol:su (E:S) (1:1, v/v) ve etanol çözücüler, ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction, ASE) tekniklerinde E:S (1:1, v/v) çözücüsü kullanılarak elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimleri, toplam fenolik madde içerikleri, CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP yöntemleriyle toplam

antioksidan özellikleri incelendi. Bitki ekstraktlarına uygulanabilen bu yöntemlere ek olarak, bağlı olarak numune yapısında bulunan ve klasik yöntemlerle tayinleri zor olan (ya da mümkün olmayan) antioksidanlar için geliştirilen ve doğrudan katı numuneye uygulanabilen yeni bir yöntem olan “QUENCHER” prosedürü de (QUick-Hızlı, Easy-Kolay, New-Yeni, CHEap-Ucuz ve Reproducible-Tekrarlanabilir) E:S (1:1, v/v) çözücü ortamında reaksiyon süresi optimizasyonları yapılarak çalışma materyallerine uygulandı. Hazırlanan ekstraktların LC-MS/MS analiziyle fenolik bileşik profilleri metot validasyonu yapılarak kalitatif ve kantitatif olarak ortaya konuldu. Bitki numunelerinin GC-MS ile yağ asidi içeriği ve ICP-MS ile metal içerik analizleri gerçekleştirildi.

En yüksek ekstraksiyon verimi CF bitkisi (havada kuru) SE E:S (1:1, v/v) ekstraksiyonunda % 42,03±0,25 ile tespit edildi. Genel olarak E:S (1:1, v/v) çözücüsünde SE ve UDE tekniklerinde ekstraksiyon verimleri birbirine yakın iken ASE verimlerinin tüm bitki numunelerinde düşük olduğu belirlenmiştir. Fenolik madde içeriği en yüksek olan ekstraktın CP bitkisinin (havada kuru) UDE tekniği ile E:S (1:1, v/v) çözücüsünde elde edilen ekstrakt olduğutespit edildi (2939,25±37,18 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g kuru bitki). Numunelerintoplam antioksidan kapasite(mmol troloks eşdeğeri (TE)/kg kuru bitki) değerleri sıralamalarının genel olarak ekstraktlara ve doğrudan katı numunelere uygulanan yöntemler baz alınarak karşılaştırıldığında QUENCHER-CUPRAC>CUPRAC, QUENCHER-ABTS>ABTS, QUENCHER-DPPH>DPPH ve QUENCHER-FRAP>FRAP şeklinde olduğu bulundu. Bu durum, QUENCHER prosedürünün geleneksel antioksidan kapasite belirleme yöntemlerine uygulandığında önemli bir avantaj getirdiğini göstermektedir.

Ekstraktların LC-MS/MS tekniği ile 19 adet fitokimyasal bileşik açısından kalitatif ve kantitatif analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre, AR bitkisinin (hava kurusu) SE tekniği ve E:S (1:1, v/v) çözücüsüyle elde edilen ekstraktında 2847,32±39,21 µg/100g ile benzoik asidin; EV bitkisinin (hava kurusu) SE tekniği ile etanol çözücüsünde elde edilen ekstraktında 9911,83±60,65 µg/100g ile klorojenik

asidin; LT bitkisinin (liyofilizerde kuru) ASE tekniği ile E:S (1:1, v/v) çözücüsüyle elde edilen ekstraktında $713,70 \pm 18,75 \mu\text{g}/100\text{g}$ ile benzoik asidin; CF bitkisinin (hava kurusu) UDE tekniği ve E:S (1:1, v/v) çözücüsüyle elde edilen ekstraktında $6221,44 \pm 88,63 \mu\text{g}/100\text{g}$ ile ferulik asidin, CP bitkisinin (hava kurusu) SE tekniği ve E:S (1:1, v/v) çözücüsüyle elde edilen ekstraktında $3956,50 \pm 51,44 \mu\text{g}/100\text{g}$ ile kafeik asidin dominant fenolik bileşiklerolduğu belirlendi. Gallik asit ve epigallokateşin gallat bileşikleri hiç bir numunede tespit edilemedi.

GC-MS ile yağ asidi içeriği analizinde laurik asit, miristik asit, pentadekanoik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, margarik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit, behenik asit ve lignoserik asit başlıca yağ asitleri olarak tespit edildi. Ayrıca, ICP-MS tekniği ile de V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Hg ve Pb metallerinin kalitatif ve kantitatif analizleri gerçekleştirildi.

Anahtar Kelimeler: *Amaranthus retroflexus* L., *Echinops viscosus* DC. subsp. *bithynicus* (Boiss.) Rech f., *Lathyrus tuberosus* L., *Chenopodium foliosum* Asch., *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent, Soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon, hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, toplam fenolik madde ve fenolik asit profili, antioksidan aktivite, LC-MS/MS, GC-MS, ICP-MS

2020, 369 Sayfa

ABSTRACT

(Ph.D. Thesis)

EXTRACTION TECHNIQUE BASED INVESTIGATION OF CHANGINGS IN BIOLOGICAL ACTIVITY AND PHENOLIC ACID PROFILE OF THE EXTRACTS FROM SOME EDIBLE NORTH EASTERN ANATOLIA ORIGINPLANTS

İnan DURSUN

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Fikret AKDENİZ

Amaranthus retroflexus L. (AR), *Echinops viscosus* DC. subsp. *bithynicus* (Boiss.) Rech f. (EV), *Lathyrus tuberosus* L. (LT), *Chenopodium foliosum* Asch. (CF), *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent (CP) edble plants from North-Eastern Anatolia origin (particle size < 125 µm) have been used in this doctoral thesis. Collected aerial parts of plants were dried in a dark room condition and lyophilizer. Dried plant samples were performed using various extraction techniques such as Soxhlet extraction (SE), ultrasound assisted extraction (UAE) and accelerated solvent extraction (ASE). Ethanol:water (1:1, v/v) and ethanol (only in Soxhlet technique) have been used as extraction solvents. Extraction yield, total phenolic content and total antioxidant properties were determined using CUPRAC, ABTS, DPPH and FRAP assays.

In addition to these common methods, which can be applied to plant extracts, the "QUENCHER" method (QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible) was also used, which can be applied directly to the solid sample. QUENCHER procedure, which is a new method developed for antioxidants that are bound in sample matrix and which are difficult (or not possible) to be determined by conventional methods, was applied to the solid samples by optimizing reaction time intervals in E:S (1:1, v / v) solvent medium. Qualitative and quantitative phenolic profile of extracted samples were determined using validated methods in LC-MS/MS. Fatty acid and metal contents of samples were analyzed using GC-MS and ICP-MS techniques, respectively.

The highest extraction yield was determined in the SE E: S (1: 1, v/v) extraction of CF plant (air dried) with the value of $42.03 \pm 0.25\%$. In general, it was determined that while extraction yields were close to each other in SE and UDE techniques in E:S (1:1, v/v) solvent medium, ASE yields were low in all plant samples. The highest phenolic content was obtained from the extract of CP plant (air dried) using the UDE technique and E:S (1: 1, v/v) as the solvent (2939.25 ± 37.18 mg gallic acid equivalent (GAE))/100 g). When the total antioxidant capacities of the samples (mmol trolox equivalent (TE)/kg dry plant) are evaluated between methods applied to extracts and directly to solid samples, the rankings are found to be as QUENCHER-CUPRAC>CUPRAC, QUENCHER-ABTS>ABTS, QUENCHER-DPPH>DPPH and QUENCHER-FRAP>FRAP. This situation revealed that the QUENCHER procedure brings a significant advantage when applied to traditional antioxidant capacity determination methods.

Qualitative and quantitative analyzes of the extracts were performed for 19 phytochemical compounds using LC-MS/MS technique. According to the results, the value of 2847.32 ± 39.21 $\mu\text{g}/100$ g benzoic acid is the dominant phenolic compound in air dried AR extract using of SE technique in E:S (1: 1, v/v) solvent medium; the value of 9911.83 ± 60.65 $\mu\text{g}/100$ g chlorogenic acid is the dominant phenolic compound in air dried EV extract of SE technique in ethanol solvent medium; the value of $713.70 \pm$

18.75 µg/100 g benzoic acid is the dominant phenolic compound in lyophilizer dried LT extract using of ASE technique in E:S (1:1, v/v) solvent medium; the value of 6221,44±88,63 ferulic acid is the dominant phenolic compound in air dried CF extract using of UAE technique in E:S (1:1, v/v) solvent medium; the value of 3956,50±51,44 µg/100g cafeic acid is the dominant phenolic compound in air dried CP extract using of SE technique in E:S (1:1, v/v) solvent medium. Gallic acid and epigallocatechin gallate was not determined in any of the sample.

Lauric acid, myristic acid, pentadecanoic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, margaric acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, behenic acid and lignoceric acid were determined as the major fatty acids using of GC-MS. In addition, qualitative and quantitative analyzes of V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Hg and Pb elements were performed with ICP-MS technique.

Keywords: *Amaranthus retroflexus* L., *Echinops viscosus* DC. subsp. *bithynicus* (Boiss.) Rech f., *Lathyrus tuberosus* L., *Chenopodium foliosum* Asch., *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent, Soxhlet extraction, ultrasonic assisted extraction, accelerated solvent extraction, total phenolic substance and phenolic acids profile, antioxidant activity, fatty acid profile, heavy metal, LC-MS/MS, GC-MS, ICP-MS

2020, 369 pages

ÖNSÖZ

Çalışmada, Kuzeydoğu anadolu kökenli bazı yenilebilir bitkilerinin ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri, antioksidan kapasiteleri ve LC-MS/MS ile kapsamlı metot validasyonu yapılarak fenolik asit profil değişiminin ekstraksiyon tekniği tabanlı incelemiştir. Bununla birlikte yeni bir yaklaşım olan QUENCHER prosedürü ile antioksidan kapasiteleri belirlenerek ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca çalışılan bitkilerin GC-MS ile yağ asidi profili ve ICP-MS ile metal içerik analizinin gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamın başlangıcından bitimine kadar, her konuda büyük yardımlarını, bilgisini, desteğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Fikret AKDENİZ'e enderin minnet ve şükranlarımı sunarım. Yine bu çalışmada emeği geçen ve Ultrasonik Banyo sistemini bizden esirgemeyen Prof.Dr. Hacali Necefoğlu'na, bitkilerin tanı ve teşhisinde Prof.Dr. Lütfi BEHÇET'e, QUENCHER analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Vural GÖKMENE'e ve öğrencisi Arş.Gör.Dr. Ecem Evrim ÇELİK'e, bitkilerin liyofilizatörde kurutma işlemleri için yardımcı olan Doç. Dr. Nuran KAHRİMAN'a ve yüksek lisans öğrencisi Kıvanç PEKER'e, istatistik analizlerinde yardımlarından dolayı Doktor Öğretim Üyesi Veysel SÜZERER'e, LC-MS/MS analizleri için SEM firması İstanbul Ar-Ge laboratuvarına ve burada çalışan yardımcı olan Gökan GÜNAY'a, bitkilerin herbaryum için hazırlanmasında ve resimlerinin çekilmesinde yardımcı olan Öğr. Gör. Ali SİNAN'a, GC-MS, ICP-MS ve Spektrofotometrik analizler için imkanlarını kullandığım Bingöl Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmada benim için maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve zaman ayıran değerli eşim Yeşim AYDIN DURSUN'a ve oğlum Yusuf Kağan DURSUN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

İMZA

İnan DURSUN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VIII
ÖNSÖZ.....	XI
İÇİNDEKİLER.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIX
TABLolar DİZİNİ.....	XXXII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXXV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENELBİLGİLER.....	4
2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	4
2.2. Antioksidanlar ve Antioksidanların Sınıflandırılması.....	8
2.2.1.Mekanizmalarına Göre Antioksidanlar.....	11
2.2.1.1. Birincil Antioksidanlar.....	11
2.2.1.2. İkincil Antioksidanlar.....	14
2.2.2. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar.....	15
2.2.2.1. Sentetik Antioksidanlar.....	15
2.2.2.2. Doğal Antioksidanlar.....	17
2.3. Toplam Fenolik Madde Tayini: Folin-Ciocalteu Metodu.....	26
2.4. Toplam Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler.....	27
2.4.1. Elektron Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri.....	27
2.4.1.1. DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi.....	27
2.4.1.2. ABTS Yöntemi / TEAK (Troluks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi).....	28
2.4.1.3. Cu(II) İyonu indirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi....	29

2.4.1.4. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Metodu.....	31
2.4.2. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin	
Yöntemler.....	31
2.4.2.1. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi.....	31
2.4.2.2. Krosin Ağartma Yöntemi.....	32
2.4.2.3. Toplam Radikal Tutma Parametresi (TRAP) Yöntemi.....	33
2.4.2.4. Luminol Yöntemi.....	33
2.4.2.5. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi.....	35
2.5. Bitkisel Kaynaklardan Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu İçin	
Kullanılan Teknikler.....	34
2.5. 1. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu.....	36
2.5. 2. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	39
2.5. 3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UDE).....	42
2.5.4. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction,	
ASE).....	46
2.6. QUENCHER Metodu.....	51
2.7. Bitkilerde Oluşan Bileşenlerin Analizinde Kullanılan Önemli Analitik	
Teknikler.....	58
2.7.1. Gaz Kromatografisi (GC).....	59
2.7.2. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	64
2.7.3. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS).....	69
2.7.3.1. LC-MS İyonlaşma Kaynağı.....	69
2.7.3.2. LC-MS Kütle analizörleri.....	73
2.7.4. LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi).....	74
2.8. Lipitler.....	77
2.8. 1. Yağ Asitleri.....	79

2.8.2. Doymuş Yağ Asitler.....	80
2.8.3. Doymamış yağ asitleri.....	81
2.8.4 Yağ Asitlerinin Sağlık Açısından Önemi.....	83
2.9. Ağır Metaller.....	84
2.9.1. Metal Analizi için Numune Hazırlama Yöntemleri.....	86
2.9.2. İndüktifleşmiş Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi (ICP-MS).....	90
2.10. Çalışma Materyalleri Hakkında Botanik Bilgi.....	95
2.10.1. <i>Amaranthus retroflexus</i> L.	96
2.10.2. <i>Echinops viscosus</i> DC. subsp. <i>bithynicus</i> (Boiss.) Rech f.	96
2.10.3. <i>Lathyrus tuberosus</i> L.	96
2.10.4. <i>Chenopodium foliosum</i> Asch.	97
2.10.5. <i>Caltha polypetala</i> Hochst. Ex Lorent.....	97
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	100
3.1. Kullanılan Malzeme, Çözücü, Reaktif ve Standart Maddeler	100
3.2. Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	101
3.3. Numune Hazırlama.....	100
3.4. Ekstraksiyon Deneyleri.....	103
3.4.1. Soxhlet Ekstraktlarının Hazırlanması.....	103
3.4.2. Ultrasonik Destekli Ekstraktların Hazırlanması	104
3.4.3. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction-ASE) Ekstraktlarının Hazırlanması	105
3.5. Folin-Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini.....	106
3.6. Antioksidan Tayin Metodları.....	107
3.6.1. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini.....	107
3.6.2. QUENCHER-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini.....	109

3.6.3. ABTS/TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)	
Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini.....	110
3.6.4. QUENCHER-ABTS/TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan	
Kapasitesi) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini.....	112
3.6.5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Antioksidan	
Aktivite Tayini.....	113
3.6.6. QUENCHER-DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle	
Antioksidan Aktivite Tayini.....	115
3.6.7. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemiyle	
Antioksidan Aktivite Tayini.....	116
3.6.8. QUENCHER-FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü)	
Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini.....	117
3.7. Sıvı Kromatografi Kütle/Kütle Spektrometre Sistemi (LC MS/MS)	
Cihazı Özellikleri ve Kromatografik Şartlar.....	118
3.8. GC- MS ile Yağ Asidi İçeriğinin Belirlenmesi.....	119
3.8.1. Yağ Ekstraksiyonu ve Yağ Asitlerinin Türevlendirilmesi.....	119
3.8.2. Yağ Asidi İçeriklerinin Belirlenmesi İçin GC-MS Koşulları.....	120
3.9. ICP-MS ile Metal İçerik Analizi	121
3.9.1. ICP-MS ile Metal İçerik Analizi İçin Örnek Hazırlanması.....	121
3.9.2. Metal İçerik Analizi için ICP-MS Koşulları.....	122
3.10. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Analizi.....	123
4. BULGULAR	124
4.1. Ekstraksiyonların Verim Yüzdeleri.....	124
4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular.....	127

4.3. Antioksidan Tayin Metodlarından Elde Edilen Bulgular.....	132
4.3.1. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar.....	132
4.3.2. QUENCHER-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini İçin Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi.....	133
4.3.3. QUENCHER-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar.....	134
4.3.4. CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC Tayin Yöntemleri İçin Toplam Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması	136
4.3.5. ABTS Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar.....	141
4.3.6. QUENCHER-ABTS Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini İçin Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi.....	142
4.3.7. QUENCHER-ABTS Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar.....	144
4.3.8. ABTS ve QUENCHER-ABTS Tayin Yöntemleri İçin Toplam Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması.....	145
4.3.9. DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar.....	149
4.3.10. QUENCHER-DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini İçin Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi.....	150
4.3.11. QUENCHER-DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar.....	152
4.3.12. DPPH ve QUENCHER-DPPH Tayin Yöntemleri İçin Toplam Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması	153
4.3.13. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar.....	158

4.3.14. QUENCHER-FRAP Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini	
İçin Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi.....	159
4.3.15. QUENCHER-FRAP Yöntemiyle Antioksidan Aktivite	
Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar.....	160
4.3.16. FRAP ve QUENCHER-FRAP Tayin Yöntemleri İçin Toplam	
Toplam Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması.....	161
4.4. LC-MS/MS ile Fenolik Bileşiklerinin Belirlenmesi ve Kantitatif Analizi...	166
4.4.1. LC-MS/MS Metod Validasyon Parametreleri.....	169
4.4.2. Doğrusallık (Lineerite).....	169
4.4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) ve Geri Kazanım (Gerçeklik).....	169
4.4.4. Belirleme Alt Sınırları (LOD) ve Tayin Alt Sınırları (LOQ).....	170
4.4.5. LC-MS/MS Metodundaki Standartların Kalibrasyon Grafikleri.....	170
4.4.6. LC-MS/MS Metodundaki Standartların Kalibrasyon Grafikleri.....	171
4.4.7. Bitki Ekstraktlarının Fitokimyasal İçeriklerinin LC-MS/MS ile	
Kantitatif Analizi	174
4.4.7.1. <i>Amaranthus retroflexus</i> L. (AR) Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin	
LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi.....	174
4.4.7.2. <i>Echinops viscosus</i> DC. subsp. <i>bithynicus</i> (Boiss.) Rech f. (EV) Bitkisinin	
Fitokimyasal İçeriğinin LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi	177
4.4.7.3. <i>Lathyrus tuberosus</i> L. (LT) Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin	
LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi	180
4.4.7.4. <i>Chenopodium foliosum</i> Asch. (CF) Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin	
LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi.....	183
4.4.7.5. <i>Caltha polypetala</i> Hochst. Ex Lorent (CP) Fitokimyasal İçeriğinin	
LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi.....	186
4.5. Bitkilerin Yağ Asidi İçeriklerinin GC-MS ile Analizinden Elde Edilen	
Sonuçlar.....	190

4.6. Bitkilerin ICP-MS ile Metal Analizinden Elde Edilen Sonuçlar	194
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	197
6 KAYNAKLAR.....	216
7 EKLER.....	251
ÖZGEÇMİŞ.....	331



ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Önemli olan bazı sentetik antioksidan maddelerin açık yapıları	16
Şekil 2.2.	Bitkilerde çok bulunan hidroksi benzoik asitler	19
Şekil 2.3.	Bitkilerde çok bulunan hidroksi benzoik asitlerin yapısı	20
Şekil 2.4.	Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	21
Şekil 2.5.	Askorbik asidin yapısı (C vitamini).	23
Şekil 2.6.	a-) Tokoferol ve b-) tokotrienollerin izomerlerinin yapıları	24
Şekil 2.7.	β -karotenin yapısı	25
Şekil 2.8.	Tanenlerin (Fenolik polimerler) yapısı.	26
Şekil 2.9.	Stilbenlerin yapıları: <i>trans</i> - ve <i>cis</i> - resveratrol ile glikozitleri	26
Şekil 2.10.	Antioksidan-DPPH radikali tepkime mekanizması	29
Şekil 2.11.	ABTS ⁺ katyonunun yapısı	30
Şekil 2.12.	Cu(II)' nin antioksidan madde (Ar(OH) _n) ile Cu (I)'e indirgenmesi.	31
Şekil 2.13.	[Fe(III)(TPTZ) ₂] ³⁺ kompleksinin antioksidan ile etkileşimi sonucu [Fe(II)(TPTZ) ₂] ²⁺ kompleks oluşumu.	32
Şekil 2.14.	Analiz edilen örnek ile şahit çözeltisi eğrileri altında kalan alan (EAKA) farkı olarak ifade edilen antioksidan aktivitesi.	33
Şekil 2.15.	Geneleksel Soxhlet ekstraktörü.	39
Şekil 2.16.	Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon sisteminin cihaz şeması	50
Şekil 2.17.	Doğrudan QUENCHER prosedürünün temel adımları ve radikal molekülleri ile katı partikülün yüzeyine bağlı antioksidan bileşenler arasındaki yüzey etkileşiminin şematik	53

gösterimi.

Şekil 2.18.	Gaz kromatografi cihazının şematik gösterimi	62
Şekil 2.19.	HPLC cihazı akış şeması	66
Şekil 2.20.	Temel bir LC / MS sistemi şematik gösterimi	72
Şekil 2.21.	İyonlaştırma yöntemlerinin seçimi	70
Şekil 2.22.	Elektrosprey iyonlaştırma tekniği	71
Şekil 2.23.	Elektrosprey iyonlaştırma teorisi şeması	73
Şekil 2.24.	Bir kuadrupol kütle analizörünün şematik diyagramı	75
Şekil 2.25.	LC-MS ve LC-MS/MS cihazlarının şematik gösterimi	77
Şekil 2.26.	Trigliserid oluşum reaksiyonu.	80
Şekil 2.27.	Monogliserid, digliserid ve trigliserid'in yapısı.	81
Şekil 2.28.	Basit ve karışık trigliseridin yapısı.	81
Şekil 2.29.	Mikrodalga fırının sisteminin şematik görünümü	90
Şekil.2.30.	Geleneksel ve mikrodalga ısıtma sisteminin şematik görünümü	91
Şekil 2.31.	ICP-MS cihazının ana kısımları şematik olarak gösterimi	93
Şekil.2.32.	ICP-MS cihazında numune analizinde gerçekleşen aşamalar	94
Şekil 2.33.	Numune giriş ve torch sistemi	95
Şekil 2.34.	Sisleştirme odası (Spray Chamber) ve sisleştirci (nebulizer) şekli	95
Şekil 2.35.	ICP-MS'de torch'ta oluşan plazma	96
Şekil 3.1.	ICP-MS metal analizinde Cr'nin kalibrasyon grafiği	123
Şekil 4.1.	Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	125

Şekil 4.2.	Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği ($\lambda=765\text{nm}$).	128
Şekil 4.3.	Numunelerin, SE, UDE ve ASE'den elde edilen ekstraktlarının Folin-Ciocalteu yöntemine göre ölçülen toplam fenolik madde içeriklerinin karşılaştırılması.	129
Şekil 4.4.	CUPRAC yönteminde troloks standardı (metanol çözücüsünde) için elde edilen kalibrasyon grafiği ($\lambda=450\text{ nm}$)	132
Şekil 4.5.	Serin ve kuru havada kurutulan numunelerin QUENCHER-CUPRAC yönteminde farklı reaksiyon sürelerine karşı toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin artışı grafiği	133
Şekil 4.6.	Liyofilizatör ile kurutulan numunelerinin QUENCHER-CUPRAC yönteminde farklı reaksiyon sürelerine karşı toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin artışı grafiği.	134
Şekil 4.7.	QUENCHER-CUPRAC deneylerinde kullanılan troloks standardının E:S (1:1, v/v) çözücüsünde elde edilen kalibrasyon grafiği ($\lambda=450\text{ nm}$)	135
Şekil 4.8.	CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin (mmol TE/kg) karşılaştırılması	138
Şekil 4.9.	ABTS deneylerinde kullanılan, troloks'un etanol:su (1:1) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarının absorbansına karşı % radikal süpürme _{troloks} grafiği ($\lambda=734\text{ nm}$)	142
Şekil 4.10.	Serin ve kuru havada kurutulan numunelerin QUENCHER-ABTS yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı reaksiyon süreleri için 734 nm'de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerleri grafiği	143
Şekil 4.11.	Liyofilizatör ile kurutulan numunelerinin QUENCHER-ABTS yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı reaksiyon süreleri için 734 nm'de ölçülen toplam antioksidan kapasite	143

(mmol TE/kg) değerleri grafiği

- Şekil 4.12. QUENCHER-ABTS deneylerinde kullanılan, troloks'un 144 etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarının absorbansına karşı troloks'un % radikal süpürme_{troloks} grafiği ($\lambda=734$ nm).
- Şekil 4.13. Numune ekstraktları ve katı numunelerin ABTS ve 147 QUENCHER-ABTS yöntemleriyle elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması
- Şekil 4.14. DPPH deneylerinde kullanılan, etanol:su (1:1, v/v) 150 çözücüsündeki troloks'un farklı konsantrasyonlarına karşı % radikal süpürme grafiği ($\lambda=525$ nm).
- Şekil 4.15. Serin ve kuru havada kurutulan numunelerin QUENCHER- 151 DPPH yöntemi ile farklı reaksiyon süreleri için 525 nm'de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin değişimi grafiği.
- Şekil 4.16. Liyofilizatör ile kurutulan numunelerin QUENCHER-DPPH 151 yöntemi ile farklı reaksiyon süreleri için 525 nm'de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin değerlerinin değişimi grafiği.
- Şekil 4.17. QUENCHER-DPPH deneylerinde kullanılan, troloks'un 152 etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarına karşı % radikal süpürme grafiği ($\lambda=525$ nm)
- Şekil 4.18. Numune ekstraktları ve katı numunelerin DPPH ve 155 QUENCHER-DPPH yöntemleriyle elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin (mmol TE/kg) karşılaştırılması
- Şekil 4.19. FRAP testleri için standart olarak kullanılan troloks'un, 158 etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarının, absorbanslarına karşı çizilen kalibrasyon grafiği ($\lambda=593$ nm)

Şekil 4.20.	Hava kurusu numunelerin QUENCHER-FRAP yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı reaksiyon sürelerine karşı 593 nm’de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin artışı grafiği	159
Şekil 4.21.	Liyofilizatör ile kurutulan numunelerinin QUENCHER-FRAP yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı reaksiyon sürelerine karşı 593 nm’de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin artışı grafiği	160
Şekil 4.22.	FRAP ve QUENCHER-FRAP yöntemlerinden elde edilen toplam antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırma grafiği	163
Şekil 4.23.	Askorbik asit’in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği	171
Şekil 4.24.	10000 ppb konsantrasyondaki 19 standardın LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin toplu kromatogramları	172
Şekil 4.25.	LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin 10000 ppb konsantrasyonundaki 19 standarda ait tekli kromatogramları	172
Şekil 4.26.	ARH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS kromatogramı	173
Şekil 4.27.	ARH numunesine ait yağ asidi metil esterlerinin GC-MS kromatogram görüntüsü.	190
Şekil 4.28.	Laurik asit metil esterinin (C 12:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu	191
Şekil 5.1.	Havada kurutulmuş numunelerin UDE E:S (1:1) ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.	208
Ek Şekil 1.	<i>Amaranthus retroflexus</i> L. bitkisine ait resimler.	250
Ek Şekil 2.	<i>Echinops viscosus</i> DC. subsp. <i>bithynicus</i> (Boiss.) Rech f. bitkisine ait resimler	251

Ek Şekil 3.	<i>Lathyrus tuberosus</i> L. bitkisine ait resimler	252
Ek Şekil 4.	<i>Chenopodium foliosum</i> Asch L. bitkisine ait resimler	253
Ek Şekil 5.	<i>Caltha polypetala</i> Hochst. Ex Lorent bitkisine ait resimler	253
Ek Şekil 6.	ICP-MS metal analizinde V'un kalibrasyon grafiği	254
Ek Şekil 7.	ICP-MS metal analizinde Mn'nin kalibrasyon grafiği.	254
Ek Şekil 8.	ICP-MS metal analizinde Fe'nin kalibrasyon grafiği.	254
Ek Şekil 9.	ICP-MS metal analizinde Co'in kalibrasyon grafiği.	255
Ek Şekil 10.	ICP-MS metal analizinde Ni'nin kalibrasyon grafiği	255
Ek Şekil 11.	ICP-MS metal analizinde Cu'un kalibrasyon grafiği.	255
Ek Şekil 12.	ICP-MS metal analizinde Zn'nin kalibrasyon grafiği.	256
Ek Şekil 13.	ICP-MS metal analizinde As'nin kalibrasyon grafiği	256
Ek Şekil 14.	ICP-MS metal analizinde Se'nin kalibrasyon grafiği.	256
Ek Şekil 15.	ICP-MS metal analizinde Ag'nin kalibrasyon grafiği.	257
Ek Şekil 16.	ICP-MS metal analizinde Cd'nin kalibrasyon grafiği.	257
Ek Şekil 17.	ICP-MS metal analizinde Hg'nin kalibrasyon grafiği.	257
Ek Şekil 18.	ICP-MS metal analizinde Pb'nin kalibrasyon grafiği.	258
Ek Şekil 19.	Gallik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	258
Ek Şekil 20.	Protokatekuik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	258
Ek Şekil 21.	Protokatekaldehit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	259
Ek Şekil 22	Gentisik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	259

Ek Şekil 23.	Katekhin hidrat'ın LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği	259
Ek Şekil 24.	Klorojenik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	260
Ek Şekil 25.	Vanilik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	260
Ek Şekil 26.	Kafeik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	260
Ek Şekil 27.	Epigallocatechin Gallat'ın LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	261
Ek Şekil 28.	Siringik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	261
Ek Şekil 29.	Vanilin'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	261
Ek Şekil 30.	Siringaldehit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	262
Ek Şekil 31.	<i>p</i> -Kumarik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	262
Ek Şekil 32.	Rosmarinik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	262
Ek Şekil 33.	<i>p</i> -hidroksi benzoik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği.	263
Ek Şekil 34.	Salisilik asit asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği	263
Ek Şekil 35.	Benzoik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği	263
Ek Şekil 36.	Ferulik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği	264
Ek Şekil 37.	ARH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı	264
Ek Şekil 38.	ARH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile	264

taranmasına ilişkin kromatogramı.

- Ek Şekil 39. ARH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 265 taranmasına ilişkin kromatogramı.
- Ek Şekil 40. ARL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 265 taranmasına ilişkin kromatogramı
- Ek Şekil 41. ARL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına 265 ilişkin kromatogramı.
- Ek Şekil 42. ARL UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 266 taranmasına ilişkin kromatogramı.
- Ek Şekil 43. ARL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 266 taranmasına ilişkin kromatogramı
- Ek Şekil 44. EVH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 266 taranmasına ilişkin kromatogramı
- Ek Şekil 45. EVH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına 267 ilişkin kromatogramı
- Ek Şekil 46. EVH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 267 taranmasına ilişkin kromatogramı.
- Ek Şekil 47. EVH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 267 taranmasına ilişkin kromatogramı.
- Ek Şekil 48. EVL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 268 taranmasına ilişkin kromatogramı.
- Ek Şekil 49. EVL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına 268 ilişkin kromatogramı.
- Ek Şekil 50. EVL UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile 268 taranmasına ilişkin kromatogramı.

Ek Şekil 51.	EVL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	269
Ek Şekil 52.	LTH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	269
Ek Şekil 53.	LTH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	269
Ek Şekil 54.	LTH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	270
Ek Şekil 55.	LTH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	270
Ek Şekil 56.	LTL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	270
Ek Şekil 57.	LTL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	271
Ek Şekil 58.	LTH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	271
Ek Şekil 59.	LTL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	271
Ek Şekil 60.	CFH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	272
Ek Şekil 61.	CFH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	272
Ek Şekil 62.	CFH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	272
Ek Şekil 63.	CFH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	273

Ek Şekil 64.	CFL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	273
Ek Şekil 65.	CFL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	273
Ek Şekil 66.	CFL UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	274
Ek Şekil 67.	CFL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	274
Ek Şekil 68.	CPH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	274
Ek Şekil 69.	CPH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	275
Ek Şekil 70.	CPH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	275
Ek Şekil 71.	CPH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	275
Ek Şekil 72.	CPL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	276
Ek Şekil 73.	CPL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	276
Ek Şekil 74.	CPL UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	276
Ek Şekil 75.	CPL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı.	277
Ek Şekil 76.	ARH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.	281

Ek Şekil 77.	ARL numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.	285
Ek Şekil 78.	EVH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.	289
Ek Şekil 79.	EVL numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.	294
Ek Şekil 80.	LTH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.	299
Ek Şekil 81.	LTL numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.	303
Ek Şekil 82.	CFH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.	307
Ek Şekil 83.	CFH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları	311
Ek Şekil 84.	CPH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları	315
Ek Şekil 85.	CPL numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları	320
Ek Şekil 86.	Miristik asit metil esteri (C 14:0)GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	320
Ek Şekil 87.	Pentadekanoik asit metil esterin (C15:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	321
Ek Şekil 88.	Palmitik asit metil esterin (C16:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	321
Ek Şekil 89.	Palmitoleik asit metil ester (C16:1) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu	322

Ek Şekil 90.	Margarik asit metil esterinin (C17:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	322
Ek Şekil 91.	Stearik asit metil esterinin (C18:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	323
Ek Şekil 92.	Oleik asit metil esterinin (C18:1) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	323
Ek Şekil 93.	Linoleik asit metil ester (C18:2) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	324
Ek Şekil 94.	Linolenik asit metil ester (C18:3) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	324
Ek Şekil 95.	Behenik asit metil ester (C22:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	325
Ek Şekil 96	Lignocerik asit metil esterinin (C24:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.	325
Ek Şekil 97	Havada kurutulmuş numunelerin SE E:S (1:1) ekstraksiyonunun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.	326
Ek Şekil 98	Liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin SE E:S(1:1) ekstraksiyonunun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.	326
Ek Şekil 99	Havada kurutulmuş numunelerin SE E ekstraksiyonunun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.	327
Ek Şekil 100	Liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin SE E ekstraksiyonunun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.	327

- Ek Şekil 101 Liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin UDE E:S (1:1) 328 ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.
- Ek Şekil 102 Havada kurutulmuş numunelerin ASE E:S (1:1) ekstraksiyonun 328 CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.
- Ek Şekil 103 Liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin SE E:S (1:1) 329 ekstraksiyonun toplam fenolik madde miktarı ile QUENCHER-CUPRAC, QUENCHER-ABTS, QUENCHER-DPPH ve QUENCHER-FRAP yöntemleri ile toplam antioksidan kapasite ilişkisi

TABLÖLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 2.1.	Reaktif oksijen ve azot türleri	5
Tablo 2.2.	Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, sübstitüsyon modelleri ve bulunduğu zengin kaynaklar	22
Tablo 2.3.	Doğada bulunan başlıca doymuş yağ asitleri ve bazı özellikleri	82
Tablo 2.4.	Doğada bulunan başlıca doymamış yağ asitleri ve bazı özellikleri	84
Tablo 2.5.	Bitkisel ilaçlar ve ürünlerdeki arsenik ve toksik metaller için ulusal sınır örnekleri	88
Tablo 3.1.	Bitkilerin isimleri, toplanma yerleri, toplanma zamanları ve herbaryum numaraları	102
Tablo 3.2.	Bitkilerin isimleri ve kurutma yönteminin kısaltmaları	103
Tablo 3.3.	Troloksun (TR) hacim-konsantrasyon değerleri	109
Tablo 3.4.	ICP analizinde kullanılan metallerin konsantrasyon aralığı ve iç standartlar	122
Tablo 4.1.	Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	124
Tablo 4.2.	Bitki numunelerinin SE, UDE ve ASE'den elde edilen ekstraktlarının Folin-Ciocalteu yöntemi toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)	128
Tablo 4.3.	QUENCHER-CUPRAC için troloks'un etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde konsantrasyon-absorbans değerleri ve kalibrasyon doğru denklemi	135
Tablo 4.4.	CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması	137
Tablo 4.5.	ABTS ve QUENCHER-ABTS yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması	146
Tablo 4.6.	DPPH ve QUENCHER-DPPH yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması	154
Tablo 4.7.	FRAP ve QUENCHER-FRAP yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması	162

Tablo 4.8.	Fenolik bileşiklerin MRM geçişleri için en uygun koşullar	167
Tablo 4.9.	LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler	168
Tablo 4.10.	<i>Amaranthus retroflexus</i> L. bitkisinin çeşitli ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi	175
Tablo 4.11.	<i>Echinops viscosus</i> DC. subsp. <i>bithynicus</i> (Boiss.) Rech f. bitkisinin çeşitli ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi	178
Tablo 4.12.	<i>Lathyrus tuberosus</i> L. bitkisinin toprak üstü kısımlarının çeşitli ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi	181
Tablo 4.13.	<i>Chenopodium foliosum</i> Asch bitkisinin çeşitli ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi	184
Tablo 4.14.	<i>Caltha polypetala</i> Hochst bitkisinin toprak üstü kısımlarının çeşitli ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi	187
Tablo 4.15.	Yağ asitleri metil esterlerinin GC-MS ile analizinden elde edilen parametreler	192
Tablo 4.16.	Bitkilerin yağ asitleri yüzde oranı (toplam yağ asitleri metil esterleri üzerinden)	193
Tablo 4.17.	ARH, ARL, EVH, EVL, LTH, LTL, CFH CFL, CPH ve CPL bitki numunelerinin ICP MS ile metal analiz sonuçları.	195
Tablo 5.1.	Bitki numunelerine uygulanan ekstraksiyonların toplam fenolik madde sıralaması	199
Tablo 5.2.	Bitki numunelerinin CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC yöntemlerinden belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri TE/kg kuru bitki türünden sıralaması	201
Tablo 5.3.	Bitki numunelerinin ABTS ve QUENCHER-ABTS yöntemlerinden belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri TE/kg kuru bitki türünden sıralaması	203
Tablo 5.4.	Bitki numunelerinin DPPH ve QUENCHER-DPPH yöntemlerinden belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri TE/kg kuru bitki türünden sıralaması	204
Tablo 5.5.	Bitki numunelerinin FRAP ve QUENCHER-FRAP yöntemlerinden belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri TE/kg kuru bitki türünden sıralaması	206

Tablo 5.6 Havada ve liyofilizatörde kurutulmuş bitki numunelerinin SE E:S 209 (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP yöntemleri ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafiklerinden elde edilen korelasyon (R^2) kat sayıları.



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAPH	: 2,2'-azobis (2-amido propan) hidroklorür
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazoline-6-sulfonik asit) radikali
ACN	: Asetonitril
APCI	: Atmosferik-basınç kimyasal iyonlaştırma
AIDS	: Acquired Immuno Deficiency Syndrome
APPI	: Atmosferik basınç fotoiyonizasyon
ASE	: Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
BHA	: Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Tolüen
BIN	: Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryumunu
CUPRAC	: Cu-II iyonu indirgeme antioksidant kapasitesi
Cu-II-Nc	: Cu-II-neokuproin reaktifi
DAD	: Diod-serili dedektör
DC	: Doğru akım
DCF	: Diklorofloresin
DCFH-DA	: Diklorofloresin-diasetat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ECD	: Elektron yakalama dedektörü
EC ₅₀ (IC ₅₀)	: Başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunu yarıya düşürmek için gerekli olan antioksidant ekstraktı konsantrasyonunu (genellikle µg/ml)
ELSD	: Buharlaştırılmalı ışık saçılımlı dedektörü
ESI	: Elektrosprey iyonlaşma
EAKA	: Eğrileri altında kalan alan
FC	: Folin-Ciocalteu
FID	: Alev iyonlaştırma dedektörü
FRAP	: Fe-III iyonu indirgeme antioksidant kapasitesi
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi

HAT	: Hidrojen atom transferine dayanan metot
HCl	: Hidroklorik asit
HCOOH	: Formik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICP	: İndüktifleşmiş Eşleşmiş Plazma
ICP-MS	: İndüktifleşmiş Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi üçlü kuadropol kütle spektrometresi
LOD	: Belirleme alt sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
MALDI	: Matris-destekli lazer-desorpsiyon
MeOH	: Metanol
mL	: Mililitre
M	: Milimolar
mM	: Molar
MRM	: Çoklu Reaksiyon Görüntüleme
MS	: Kütle spektrometresi
MS ⁿ	: Çoklu MS
m/z	: Kütle/yük
Nc	: Neocuproin (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)
ng	: Nano gram
ORAC	: Oksijen radikal absorban kapasitesi
PG	: Propil gallat
ppm	: Parts per million
ppb	: Parts per billion
QE	: Quercetin eşdeğeri
R [•]	: Radikal
RF	: Radyo frekans
RID	: Refraktif indeks dedektör
RSD	: Bağlı standart sapma
RP-HPLC	: Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RSM	: Cevap yüzeyi metodolojisi

RT	: Alıkonma zamanı
SE	: Soxhlet ekstraksiyonu
SIM	: Seçilmiş iyon görüntüleme
SS	: Standart sapma
TBHQ	: Tersiyer butil hidrokinon
TE	: Troloks eşdeğeri
TEAK	: Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi
TPTZ	: 2,4,6-tri[2-pridil]-s-triazin
TRAP	: Toplam Radikal Tutma Parametresi
UDE	: Ultrasonik destekli ekstraksiyon
TROLOKS	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit
UHPLC	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV	: Ultraviyole
YAME	: Yağ asitlerinin metil esterleri
μg	: Mikro gram
μL	: Mikro litre
μM	: Mikro molar
$\beta\text{-PE}$	: β -fikoeritrin

1. GİRİŞ

Canlılar ve insanlar için zararlı olan serbest radikaller radyoaktif ışınlar, sigara dumanı, çevre kirliliği, pestisitler, bozuk besinler, fabrikalardan çıkan kirli duman ve atık kimyasallardan ve canlıların vücudunda meydana gelen yaşamsal faaliyetler sonucu oluşmaktadır. Canlı organizmasında serbest radikallerin sayısının artmasıyla var olan dengenin bozunması sonucu oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stresin oluşmasıyla serbest radikallerin artışı doku hasarına, hücre başkalaşımına ve ölümüne, proteinlerin yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Canlı organizmada serbest radikallerin sayısının artmasıyla var olan veya dışarıdan alınan antioksidanlar ile denge oluşmadığı durumda; meydana gelen oksidatif stres meydana gelir. Bu durumun oluşması hücre hasarı ve yaşlanması, kalp ve damar rahatsızlıkları, şeker hastalığı, sinir sistemi bozuklukları, bağışıklık sisteminin zayıflaması, lipoprotein (LDL) oksidasyonu, solunum yolu hastalıkları, DNA ve hücre zarlarının tahribata uğraması ve birçok kanser türünün oluşumunda önemli rol oynar. Antioksidanlar, ortamda var olan serbest radikalleri gidererek etkilerini önemli düzeyde azaltabilen moleküllerdir (Halliwell and Aruoma, 1991).

Canlı organizmalarda serbest radikallerin verdiği hasarlardan korunmak için antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu savunma sisteminin o andaki kapasitesini aşar ise serbest radikallerin sayısında artış görülür. Antioksidanlar, serbest radikallerin canlılara verdiği hasarı önleyen veya yavaşlatan maddelerdir. Son zamanlarda yapay antioksidanların sağlığa olan zararlarının tespit edilmesiyle gıda kimyası, farmakoloji, tıp ve birçok ilgili alanda bitkilerden elde edilen doğal antioksidan özellik gösteren bileşenlere olan ilgi giderek artmaktadır (Rice Evans ve ark., 1997). Antioksidanlar organizmadaki radikallerin yapmış olduğu tahribatı engelleyen ve gıdaların bozunmasını yavaşlattığı için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalar bitkilerden elde edilen doğal antioksidan özellik gösteren bileşenlerin önemi artmış durumdadır (Kulisic ve ark. 2004).

Bilim ve teknolojinin gelişmesiyle bitkisel kaynaklı kimyasalların aktivitelerinin tespit edilmesiyle ilgili çalışmalara duyulan ilgi giderek artmaktadır. Bitkilerden izole edilen bileşenler birçok tıbbi özelliğe sahip gruplar bulunmaktadır. Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler önemli derecede biyolojik aktivite ve antioksidan özellik göstermektedir. Bitkilerden çeşitli ekstraksiyon teknikleriyle elde edilen sekonder metabolitler fenolik asitler, fenolik glikozitler, flavonidler, antosiyaninler, taninler, lignanlar, kateşinler, fenil propanoidler doymuş laktonlar gibi antioksidan özellik gösteren birçok grup içermektedir (Liyana Pathirana ve ark. 2006; Banerjee ve Bonde 2011).

Yapılan çalışmalarda fenolik bileşikler çok sayıda hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Fenolik bileşiklerin kan akışını düzenleyen nitrik oksit oluşumunu düzenlemede (Leikert ve ark, 2002), kanser hücresi oluşumunun engellemesi (Rice-Evans ve ark., 1996), kalp ve damar hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde (Hertog ve ark., 1993; Ness ve Powles, 1997) kullanıldıkları bildirilmiştir. İnsanların tüketebildiği birçok gıdalarda, biyolojik örneklerde ve saf halde bulunan antioksidan bileşiklerin kapasitelerini belirleyebilmek için birçok yöntem geliştirilmiştir (Apak ve ark., 2004, Benzie ve Strain, 1996; Benzie ve Strain, 1999; Brand-Williams, 1995; Re ve ark., 1999). Bu antioksidan aktivite belirleme yöntemleri ile toplam antioksidan kapasite ölçülürken klasik çözücü ekstraksiyonu, Soxhlet ekstraksiyonu (SE), ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction, ASE) gibi yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak su, organik çözücüler veya ikisinin çeşitli oranlardaki karışımında elde edilen ekstraktları kullanılır. Burada kullanılan çözücüye geçebilen antioksidan maddeler ile uygun çözücüde bulunan radikallerin etkileşiminden antioksidan kapasite belirlenmektedir.

Gıdalarda bulunan çözünabilir yapıdaki antioksidan maddelerin uygun bir çözücüde çözündükten sonra bağlı formda bulunan antioksidan yapılar için çeşitli işlemlerin yapılması gerekmektedir. Bu durum işlem süresini ve sayısını artırarak analiz için olumsuz durumlar meydana getirmektedir. Bu sorunları ortadan kaldırmak için Gökmen

ve çalışma arkadaşları (2009), katı örneklerle ekstraksiyon ve hidroliz işlemi uygulamadan çözünen ve çözünmeyen maddelerin literatürde yaygın şekilde kullanılan toplam anktioksidan kapasite yöntemlerine direk olarak uygulanabilen hızlı (QUick), kolay (Easy), yeni (New), ucuz (CHEap) ve tekrarlanabilir (Reproducible) olmasından dolayı “QUENCHER” metodu ön plana çıkmaktadır (Gökmen ve ark. 2009).

Bu doktora tez çalışmasında Kuzey Anadolu kökenli tüketilebilir *Amaranthus retroflexus* L., *Echinops viscosus* DC. Subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f., *Lathyrus tuberosus* L., *Chenopodium foliosum* Asch (CF), *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent bitkilerinin toprak üstü kısımları serin ve kuru havada ve liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin parçacık boyutu 125 µm'den küçük kısımları SE tekniğinde etanol:su (1:1, v/v) ve etanol çözücüleri, UDE ve ASE tekniklerinde etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü kullanılarak elde edilen ekstrelerin ekstraksiyon verimi, Folin Ciocalteu metodu ile toplam fenolik madde içerikleri, toplam antioksidan özellikleri CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP yöntemleriyle incelenmiştir. Farklı ekstraksiyon teknikleriyle elde edilen ekstraktların LC-MS/MS analiziyle sekonder metabolit olan fenolik bileşik içeriklerinin metot validasyonu yapılarak kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Ayrıca tüm bitki numunelerin parçacık boyutu 125 µm'den küçük numunelerine toplam antioksidan kapasitesini doğrudan belirlenmesine imkan sunan QUENCHER prosedürü kullanılarak QUENCHER-CUPRAC, QUENCHER-ABTS, QUENCHER-DPPH ve QUENCHER-FRAP işlemleri ile antioksidan özellikleri, GC-MS ile bitkilerin yağ asidi içeriği analizi ve ICP-MS ile bitkilerin metal içerik analizinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENELBİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

“*Serbest radikaller*”, atomik veya moleküler yapıda dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunduran, başka yapılar ile kolay bir şekilde elektron alıp verebilen yüksek reaktiviteye sahip kararsız kimyasal türler olarak bilinirler (Akkuş, 1995). Serbest radikallerin oluşumu, canlıların normal metabolik olaylarının gerçekleştiği durumlarda oluşabildiği gibi birçok kimyasal madde, güneşin zararlı UV ışınları, ozon tabakasındaki kozmik ışınlar, X-ışınları, çevre kirliliği, sanayi atıkları, petrokimya sanayinde kullanılan ve üretilen ürünler, stres, ilaçlar, virüsler, enfeksiyon, sigara dumanı ve araçların egzoz gazları gibi bir çok dış unsur da etkili olabilmektedir (Sies, 1991; Akkuş, 1995; Young ve Woodside, 2001; Ertuğrul Karaçalı, 2006; Tekeli ve Sezgin, 2007; Arslan Burnaz, 2007).

Serbest radikaller kararsız olmaları ve yüksek reaktivite gösterdiklerindendolayı organik veya inorganik kimyasallar, yağlar, karbonhidratlar, proteinler ve DNA gibi yapılar ile etkileşime girerek serbest hale gelir. Serbest radikaller dış orbitalindeki elektron eksikliğini etkileşime girdiği atom veya moleküllerden giderirken, elektronunu veren bu yapı kararsız ve reaktif hale dönüşerek yeni bir serbest radikal meydana getirir. Bu olay sürekli devam ederek serbest radikal oluşumuna neden olan otokatalitik bir reaksiyon başlar (Akkuş, 1995).

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için organizmalarındaki oksijeni ATP üretiminde kullanırlar. Hücreler yaşamını devam ettirebilmek için oksijenden enerji üretimi esnasında çok az miktarlarda da olsa zararlı yan ürün olan reaktif oksijen türleri-serbest oksijen radikalleri oluştururlar. Bununla birlikte toksik maddeler etrafındaki moleküller ile etkileşerek serbest oksijen radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu radikallerin meydana gelmesini ve verecekleri hasarı engellemek için organizmada

birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Oluşan serbest radikallerin miktarı organizmada bulunan savunma mekanizmasının kapasitesini aştığı durumlarda oksidatif stres meydana gelmekte ve bu durum hücrelerin lipid, protein, DNA, enzim, ve karbonhidrat gibi önemli yapılarında hasara yol açmaktadır (Akkuş, 1995; Aruoma, 1998). Oksijen canlıların yaşamı için kesinlikle gereklidir; fakat çok yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda ya da dış etmenlerin etkili olduğu bazı durumlarda serbest radikal kaynağı olan reaktif oksijen türlerini meydana getirebilmekte ve bu türler de çeşitli toksik özellikler sergileyebilmektedirler (Mandal ve ark., 2009). Canlı organizmalarda bulunan proteinler, DNA, RNA, yağlar ve karbohidratların, reaktif oksijen türleri tarafından oksidasyona uğramaları sonucu hücre ve doku hasarı meydana gelmektedir (Kameda, 2003). Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir (Aruoma ve Cuppet, 1997).

Tablo 2.1: Reaktif oksijen ve azot türleri

Reaktif Oksijen Türleri		Reaktif Azot Türleri	
Radikaller	Radikal Olmayanlar	Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit (O_2^-)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Azot Oksit ($NO\cdot$)	Nitröz Asit (HNO_2)
Hidroksi ($HO\cdot$)	Hipokloröz Asit ($HClO$)	Azot dioksit (NO_2)	Nitrozil Katyonu (NO^+)
Peroksi (RO_2)	Hipobromöz Asit ($HBrO$)		Nitroksi Anyonu (NO^-)
Alkoks ($RO\cdot$)	Ozon (O_3)		Diazottetraoksit (N_2O_4)
Hidroperoksi (HO_2)	Singlet Oksijen ($^1\Delta_g \text{ } ^1O_2$)		Diazottrioksit (N_2O_3)
			Peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$)
			Peroksinitröz Asit ($ONOOH$)
			Nitronyum Katyonu (NO_2^+)
			Alkil peroksinitrit ($ROONO$)

Canlı organizmalarda serbest radikaller genellikle elektron aktarımından dolayı meydana gelmektedir. Meydana gelen bu serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü

veya yüksüz olarak bulunabilirler (Akkuş, 1995). Serbest radikallerden bazıları canlı metabolizmasında sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bazı durumlarda miktarlarında anormal artışlar görülmektedir. Bazı serbest radikaller ise canlı metabolizmasında çok az miktarda oluşur ya da hiç oluşmazlar. Sigara dumanı, kirli hava, pestisitler, radyoaktif ışımlar, serbest geçiş metallerinin iyonları gibi dış kaynaklar da serbest radikal oluşumunu hızlandırabilirler (Gülçin ve ark. 2003).

Canlı organizmasında meydana gelen serbest radikaller bertaraf edilmezler ise hücre zarının proteinlerine etki ederek hücrelerin parçalanıp yok olmasına, hücre zarının yapısında bulunan lipidlerin ve proteinlerin yapısını bozarak hücre zarının sertleşip işlevselliğini kaybetmesine neden olurlar. Ayrıca insan vücudunda hücrelerin çekirdek zarının parçalanmasına neden olarak DNA'nın etkilenmesi dolayısıyla genetik şifrenin bozulması, bağışıklık sistemine olumsuz yönde etki ederek bağışıklık sisteminin çökmesi gibi önemli hasarlara yol açabilirler. Metabolizmada gerçekleşen olaylar sonucunda oluşan yüksek etkinliğe sahip olan serbest radikallerin, karşılaştıkları moleküller ile kolay bir şekilde tepkimeye girdiği ortaya konulmuştur. Bundan dolayı gen mutasyonuna, hücrelerde önemli derecede tahribata, dokularda geri dönülemez değişimlere ve canlının daha erken yaşlanmasına yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Storz ve Imlay, 1999).

Serbest radikallerin DNA'ya hasar vermesi, kanser oluşumuna yol açan en önemli etmenlerden biridir. Bazı durumlarda serbest radikal konsantrasyonlarının, hücrelerin serbest radikallere karşı geliştirmiş oldukları savunma mekanizmalarının kapasitesini aştığı görülebilir (Guyton ve Kensler 1993). Organizmalar, serbest radikallerin oluşturduğu hasarlardan korunmak ve olumsuzlukları minimuma indirmek, en küçük bir olumsuzluğun dahi etkilerini en aza düşürmek için anti-oksidatif korunma mekanizması geliştirmektedirler (Tunalıer ve ark., 2002). Canlı organizmada serbest radikallerin oksidasyona başlamasında, gelişmesinde ve tamamen durdurulmasında önemli rol oynayarak oksidatif stresi azaltan maddelere "*antioksidan*" adı verilir. Antioksidanlar

organizmanın iç dengesinin sabit kalmasına yardımcı olan, canlıların kendine özgü savunma mekanizmalarıdır (Akay Diri, 2006).

Canlı organizmalarda serbest radikallere karşı geliştirilen anti-oksidatif koruyucu mekanizmanın yetersiz olduğu durumlarda bazı tahribatlar meydana gelir. Serbest radikallerin miktarı çoğaldıkça bu tahribatlar artarak yaşlanmayı hızlandırır. Hücrelerin ölümü, dokuların ve beyin damarlarının ölümünü ve deformasyonunu beraberinde getirir (Bilaloğlu, 1999).

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin kanıtlanmış olumsuz etkilerinden bazıları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Çok sayıda patolojik etki oluşturmaktadırlar (Halliwell 1994).
- Kanser oluşumunun farklı evrelerinde açıkça görülmektedirler (Dreher ve Junod, 1996).
- Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun damar tıkanıklığı (ateroskleroz) oluşumunda önemli etken olduğu düşünülmektedir (Epstein ve ark., 1989).
- β hücrelerinin bağışıklık sisteminin yıkımına ve şeker hastalığına neden olmakta, ayrıca insülinin aktivitesini düşürmektedirler (Ceriello, A. 2000).
- Gözde bulunan proteinleri oksidasyona uğratarak katarakt oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (Davies, 1990).
- Birçok patolojik hastalığın gelişiminde önemli derecede rol oynayan serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşması, damar sertliği, beyin fonksiyonlarında azalma ve kanser gibi hastalıklara ve ayrıca çeşitli türden diğer iltihablı hastalıklara yol açmaktadır (Pinelo ve ark., 2004).

2.2. Antioksidanlar ve Antioksidanların Sınıflandırılması

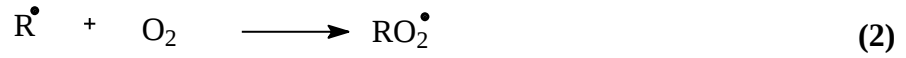
Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşmasını engellemek ve ortaya çıkardığı oksidatif tahribatın etkisini yavaşlatmak, durdurmak ya da tamamen ortadan kaldırmak için organizmanın kendi savunma mekanizmasıyla üretilen veya organizmaya savunma amaçlı dışarıdan hazır olarak alınan maddeler “*antioksidan maddeler*” olarak tanımlanırlar (Banerjee, 2003). Canlılar yaşamsal faaliyetlerini devam ettirirken organizmalarında antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin var olması, yaşam için önemli bir gerekliliktir. Organizmada bulunan antioksidan özellikteki maddeler antimutajenik, antikarsinojenik, yaşlanmayı yavaşlatıcı gibi önemli etkiler sergilemektedirler (Cook ve Samman, 1996).

Yapılan çalışmalar sonucu insan vücudunda antioksidan bileşiklerin eksikliğinde serbest radikallerin mekanizmalarının neden olduğu oksidatif stresin, lipid peroksidasyonu, enzimlerin çalışması ve çalışmaması, sıtma, eklem iltihabı, kalp-damar rahatsızlıkları, şeker hastalığı, parkinson, beyin ve sinirsel hastalıklar a neden olmakta., Ayrıca böbrek bozuklukları, bağışıklık sistemi bozuklukları, kireçlenme, kanser, DNA hasarı, AIDS ve yaşlanma gibi hastalıklar ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir (Halliwell, 1997; Auroma, 1998; Enrique Cadenas ve Lester, 2002).

Canlı organizmasında gerçekleşen zincirleme reaksiyona göre, oksijen ile etkileşime girerek otooksidasyona uğrayabilen bileşikler, oksijenle bağ oluşturan etkin peroksit radikali ve türevleri, sahip oldukları enerjilerini etraflarında bulunan ve yükseltgenebilme özelliğine sahip moleküllere aktararak zincirleme otooksidasyon tepkimesinin devam etmesini sağlamaktadırlar. Antioksidan bileşikler oksidanlardan reaksiyonun başlayabilmesi için gerekli olan enerjiyi kolayca alırlar, fakat bu enerjiyi etrafındaki başka bir moleküle aktarmayarak devam eden zincirleme otooksidasyon reaksiyonunu durdururlar. Ortamda var olan antioksidanlar zincirleme gelişen

otooksidasyon tepkimesinde araya girerek okside olabilen moleküllerin yükseltgenmesini engeller (Keskin ve Erkmen, 1987).

Antioksidanların serbest radikaller ile yapmış oldukları reaksiyon basamakları formül 1, 2, 3 ve 4'te gösterilmektedir.



(R: kararlı molekül, R[•]: radikal, AH: Antioksidan molekülü, A[•]: etkin antioksidan molekülü) (Shahidi,1997).

Antioksidan bileşikler kolay bir şekilde yükseltgenirler ve kendi kararlı yapılarının bozulmasıyla zincirleme reaksiyonu durdururlar. Antioksidan bileşikler belirli bir süre için yükseltgenebilme özelliğine sahip bileşiklerdir koruyabilir ve bu sürenin sonunda ortamda bulunan madde yükseltgenerek bozunur (Tufan, 2012).

Son zamanlarda beslenmenin insan sağlığındaki önemi dikkate değer bir şekilde artmaktadır (Podsędek, 2007). İnsanların günlük olarak tükettiği besinler oksidan ve antioksidan birçok madde bir arada bulunmaktadır. Bu nedenle organizmadaki fonksiyonların işleyişinde sorunlar olmaması için oksidasyona neden olan serbest radikaller ile antioksidanlar arasında bir denge olmalıdır (Ames, 1983; Lobo ve ark., 2010).

Organizmalar serbest radikallerin vermiş olduğu hasardan korunmak için antioksidatif savunma mekanizmalarına sahiptir. Bu antioksidatif mekanizmanın işleminde

aksaklıklar meydana gelir ise organizmada serbest radikallerin sayısı artarak oksidasyona sebep olur. Antioksidan bileşikler, serbest radikallerin organizmaya verdiği hasarı azaltan, durduran ve yaşamsal yapıların hasara uğramasını engelleyen maddelerdir. Antioksidan maddeler, serbest radikallerin gerçekleştirdiği zincir reaksiyonunu durdurarak oksidasyonu engellemektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda sentetik antioksidanların olumsuz etkilerinin belirlenmesi ile gıda kimyası ve tıbbın, doğal bitkilerden elde edilen antioksidan maddelere verdiği önem giderek artmıştır (Rice Evans ve ark., 1997).

Doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler çok sayıda tıbbi özellikte fitokimyasal madde grupları içermektedir. Bu fitokimyasalların en önemli gruplarından biride antioksidan özellik gösteren moleküllerdir. Antioksidanlar yapılarındaki farklılıktan dolayı kendi içinde gruplara ayrılmaktadırlar. Doğal antioksidanlar, bitkisel ve hayvansal gıdalardan elde edilen özütlerde veya gıda işleme sürecinde ortaya çıkan bileşiklerdir. Doğal antioksidan bileşikgruplarının en önemlilerinden biri de polifenolik bileşiklerdir. Bunların bazıları fenolik asitler, flavonoidler, flavanoidler, flavanoller, antosiyaninler, taninler, lignanlar ve kateşinler olarak sıralanabilirler (Liyana Pathirana ve ark. 2006).

Antioksidanlar sahip oldukları özellikler bakımından farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. İlk olarak kimyasal reaksiyon mekanizmalarına göre değerlendirildiğinde birincil (primer) ve ikincil (sekonder) antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar. Antioksidanların kaynakları ve üretimleri değerlendirildiğinde doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olarak iki grupta incelenebilir. Antioksidanlardan bazıları birden çok aktivite mekanizmasına sahip olması bakımından çok fonksiyonlu olarak tanımlanabilirler (Reische ve ark. 2002; Halliwell ve Gutteridge 1989). Antioksidanlar kimyasal bileşenlerine göre de sınıflara ayrılabilirler fakat bu gruptaki antioksidanların sınıflandırması mekanizmalarının işleyişi göz önüne alınarak birincil ve ikincil antioksidanlar olarak da yapılabilmektedir (İzol, 2016). Ayrıca enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde bir sınıflandırma da yapılmaktadır (Ratnam ve ark., 2006).

2.2.1. Mekanizmalarına Göre Antioksidanlar

2.2.1.1. Birincil Antioksidanlar

Birincil antioksidan moleküller veya devam eden reaksiyonu durduran antioksidanlar, oto-oksidasyonun başlatma adımını geciktiren, durduran ve yayılma adımını kesen serbest radikal inhibe edicilerdir.

Oto-oksidasyon reaksiyon zincirinin ilerleme adımları şu şekilde gerçekleşir.

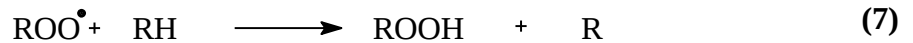
- Oksidasyonun başlatılması için doymamış bir lipitten bir karbon atomuna hidrojen koparılarak bir lipit (alkil) radikali ($R^\bullet$) oluşur (Formül 5).



- Oluşan yüksek derecede reaktif lipit radikali devam eden reaksiyonda oksijen ile reaksiyona girerek bir peroksi radikali ($ROO^\bullet$) açığa çıkar (Formül 6).



- Peroksi radikalleri ($ROO^\bullet$) devam eden basamaklarda lipit ile tepkimeye girerek bir hidroperoksitler ($ROOH$) ve tekrar kararsız lipit radikalleri ($R^\bullet$) meydana gelir (Formül 7).



- Sonraki basamakta oluşan lipit radikalleri ($R^\bullet$) ortamda var olan oksijenler ile tepkimesi sonucu peroksi radikalleri oluşur. Oluşan peroksi radikalleri ile

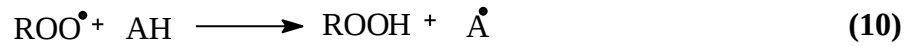
kendiliğinden devam eden (otokatalizörlü) bir oksidatif mekanizmaya yol açar (Formül 6)

- Hidroperoksitler (ROOH) parçalanıp radikaller oluşturarak reaksiyon hızının artmasına neden olmaktadır. Bu reaksiyonlara çoğalma adımları denir (Formül 8 ve Formül 9).



Hidroperoksit parçalanması sonucu, oksidasyonun ilerleyen aşamalarında kötü koku ve tatlara neden olur (Reische ve ark., 2002).

Birincil antioksidanlar (AH) aynı ortamda bulunan lipit radikalleri (R[•]) ve peroksi radikalleriyle (ROO[•]) tepkimeye girerek radikalik özelliklerini kaybederler. Birincil antioksidanlar sahip oldukları hidrojen atomlarını, lipit radikallerine aktararak daha kararlı olan ve otoksidasyonu daha da azaltan lipit türevleri ve antioksidan radikallerini (A[•]) oluşturur. Birincil antioksidanlar hidrojen sunucu olarak görev yapıp peroksi radikallerine lipitlerden daha fazla ilgi gösterirler. Oto-oksidasyon sonucu ortaya çıkan peroksi ve oksidasyon (RO[•]) radikalleri birincil antioksidan tarafından kararlı hale dönüştürülür (Formül 10 ve Formül 10). Birincil antioksidanlar otoksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan lipit radikalleri ile doğrudan reaksiyona girebilirler (formül 12) (Reische ve ark., 2002).



Hidrojen atomunun aktarılması ile oluşan antioksidan radikallerin ($\text{A}^\bullet$), lipidlere olan reaktivite etkisi çok düşüktür. Bu nedenle antioksidan radikalının oksijen ve lipitler ile reaksiyonun hızı azalır. Antioksidan radikal kararlı rezonans yapılar meydana getirebilmek için fenol halkasının etrafında eşleşmemiş elektronun delokalizasyonu sonucu kararlı hale gelir. Antioksidan radikaller peroksi radikali (Formül 14), oksi radikali (Formül 15) ve diğer antioksidan radikalleri (Formül 16) ile sonlandırma reaksiyonlarına katılabilir. Antioksidan dimerlerin oluşumu katı ve sıvı yağlarda belirgindir ve fenolik antioksidan radikallerin kolaylıkla sonlandırma reaksiyonlarına girdiğini gösterir.



Antioksidanlar, radikal olmayan formunda bulunduğu sürece otokatalitik serbest radikal zincir mekanizmasını etkili bir şekilde durdurur. Oto-oksidasyona başlamadan önce, antioksidanların sayılarının azaldığı ve serbest radikallerin sayılarının arttığı bir indüksiyon süreci olması gereklidir. Bu nedenle, birincil antioksidanların, fenol halkasının etrafında eşleşmemiş elektronun delokalizasyonu (sıklık yayılma) aşamaları meydana gelmediğinde, oksidasyonun indüksiyon ve başlatma aşamaları sırasında ilave

edilmeleri daha etkili olmalarına neden olur. Radikal süpürmeye ek olarak, birincil antioksidanlar hidroperoksitleri indirgeyerek hidroksi bileşiklerine dönüşebilir. Bununla birlikte, birincil antioksidanların antioksidatif mekanizmasının temeli radikal süpürme olarak bilinmektedir (Reische ve ark. 2002).

Birincil antioksidanlar, halkalı yapıya çok sayıda çeşitli süstitüe grupların bağlanabildiği mono- veya polihidroksi fenollerdir. Elektron veren gruplar, fenolün hidroksil grubuna göre orto ve para konumundaki süstitüsyondan kaynaklı indüktif etki ilebileşğin antioksidan aktivitesini arttırır. Bu engellenmiş fenolik antioksidanlar, hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu artırarak reaktivitesini azaltır. Butil veya etil gruplarının hidroksile para konumunda süstitüsyonu antioksidan aktiviteyi arttırır. Bununla birlikte, sterik engel nedeniyle, para pozisyonlarında daha uzun zincirli veya dallanmış alkil gruplarının varlığı antioksidan etkinliğini azaltabilir. Dallanmış alkil gruplarının orto pozisyonlarındaki süstitüsyonları fenolik antioksidanın kararlı rezonans yapıları oluşturma yeteneğini arttırmakta ve antioksidan radikalinin zincir reaksiyonlarına katılma yeteneğini ise azaltmaktadır (Reische ve ark. 2002).

Gıdalarda en sık kullanılan birincil antioksidanlar sentetik bileşiklerdir. Birincil sentetik fenolik antioksidanların önemli örnekleri arasında bütillenmiş hidroksianisol (4-metoksi-3-ter-butilfenol, BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (2,6-di-ter-butil-p-hidroksitoluen, BHT), propil gallat (3,4,5-trihidroksi benzoik asit propil ester, PG) ve tert-butilhidrokinon (2-tert-butylbenzene-1,4-diol, TBHQ) bulunur. Bununla birlikte, gıdaların birkaç doğal bileşeni de birincil antioksidanlar olarak işlev görür ve yaygın olarak gıdalara eklenir. Tokoferoller en yaygın kullanılan doğal primer antioksidanlardır. Karotenoidler, mekanizmaları fenolik antioksidanlardan farklı olmasına rağmen, birincil antioksidan aktiviteye sahip farklı bir doğal bileşik grubudur (Reische ve ark. 2002).

2.2.1.2. İkincil Antioksidanlar

İkincil veya önleyici antioksidanlar birçok olası mekanizma yoluyla etki eder. Bu antioksidanlar, birkaç farklı şekilde oksidasyon hızına etki ederek yavaşlatırlar, ancak serbest radikalleri daha kararlı hale dönüştürmezler. İkincil antioksidanlar prooksidan metaller ile kompleks oluşturarak onların aktifliklerini giderebilir, primer antioksidanlara hidrojen sağlayabilir, hidroperoksidleri kararlı türlere dönüştürebilir, singlet oksijeni devre dışı bırakabilir, ultraviyole radyasyonu soğurabilir ve oksijen yakalayıcı olarak davranabilir. Bu antioksidanlar genellikle sinerjistik etki göstererek birincil antioksidanların antioksidan aktivitelerinin artmasını sağlarlar (Reischeve ark. 2002). İkincil antioksidanlar etki mekanizmasına göre üç başlık altında değerlendirilebilir. Bunlar;

- Kompleks oluşturan ikincil antioksidanlar: Sitrik asit, fosforik asit
- Oksijen gidericiler ve indirgeyiciler: Askorbik asit, askorbil palmitat
- Singlet oksijen süpürücüler: Karotenoitler (Reische ve ark., 2002).

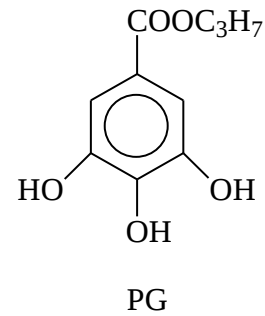
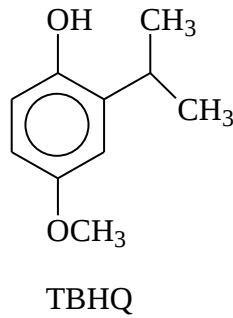
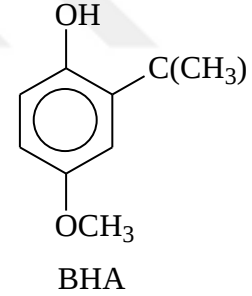
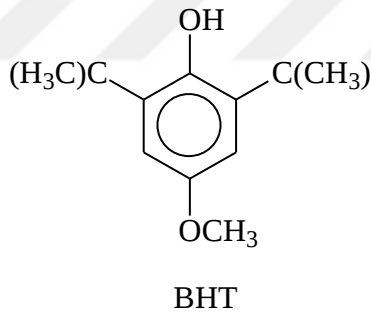
2.2.2. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar

2.2.2.1. Sentetik Antioksidanlar

Gıda sanayisinde üretilen ürünlerin zamanla ekşimesi, renginin bozulması, kokması ve görünümündeki bozukluklar gibi olumsuzlukların oksidatif bozunmalardan kaynaklandığı bilinmektedir. Gıdaların üretim aşamasında ve depolanmasında yağların oto-oksidasyon ve enzimatik oksidasyonu, ürünün kalite kriterleri olan yumuşaklık, tat, renk ve besin değeri gibi parametrelerinde olumsuz etkiler oluşturan bir reaksiyondur. Oksidasyon sonucu serbest radikallerin oluşumunu geciktirmek, engellemek ve tamamen durdurmak için zincir reaksiyonunun başlama ve çoğalma aşamalarını

durdurmak maksadıyla gıda ürünlerine genelde bu antioksidanlar ilave edilmektedir (Abdille ve ark., 2005).

Sentetik antioksidanlar oksijene etki ederek gıdaların bozunmasını geciktirirler, tat, renk ve koku gibi ürün kalitesinde önemli olan özelliklerini muhafaza ederek bir çeşit koruyucu ajan gibi davranırlar. Bu nedenle de gıdaların raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadırlar. Sentetik antioksidanların çoğu gıda endüstrisinde, kozmetik sanayisinde ve ilaç sanayisinde önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde birçok endüstride çeşitli ürünlerin oksidasyon sonucu bozulmasını önlemek için kullanılan sentetik antioksidanların en önemlileri BHA (Butillenmiş hidroksi anisol), Butillenmiş hidroksitoluen (BHT), Propil gallat (PG) ve Tersiyer butil hidrokinon (TBHQ) olarak bilinmektedir ve busentetik antioksidan maddelerin açık yapıları Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Önemli olan bazı sentetik antioksidan maddelerin açık yapıları

Bu sentetik antioksidanlar, oksidasyon reaksiyonu başlamadan önce gıdalar ile karıştırılırlar ve böylece oksidasyonu önleyerek gıdaların raf ömrünü uzatırlar (Yamazaki ve ark., 2007). Ancak genellikle yağ oranı yüksek olan gıdaların oksidasyonunu engellemek, raf ömrünü uzatmak için besin maddelerine ilave edilen BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların kanserojen etki gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Grice, 1988; Wichi, 1998; Williams ve ark., 1999). BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların toksik etkiye neden olduğu ve muhtemel karsinojen oldukları düşünüldüğünden kullanımlarına kanunen sınırlamalar getirilmiştir. Bu nedenle sanayide birçok alanda sentetik antioksidanların yerine doğal kaynaklardan elde edilen antioksidan bileşiklerin kullanımı için kaynak araştırmasına verilen önem giderek artmıştır. Böylece, gıda ve sağlık alanındaki uzmanlar doğal antioksidan maddelere daha fazla ilgi duymaya başlamışlardır (Abdille ve ark., 2005).

2.2.2.2. Doğal Antioksidanlar

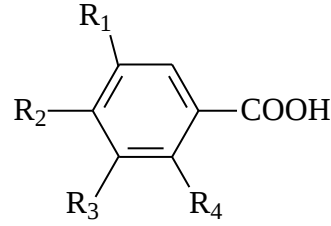
Bitkilerin yaşamlarını sürdürebilmeleri, ihtiyaç duydukları madde ve enerjinin karşılanması için gerçekleşen kimyasal tepkimelerin tümü metabolizmayı meydana getirir. Bitkiler, metabolik reaksiyonlarda primer ve sekonder metabolit olarak birçok organik bileşik üretir. Primer metabolitler canlılar için gerekli olan nükleik asitler, karbohidratlar, yağlar, aminoasitler, proteinlerdir. Üretilen primer metabolitler canlının solunum, fotosentez, büyüme ve gelişme gibi hayati metabolik olaylarında kullanılmaktadır. Bitkilerde sekonder metabolizma sonucu yüksek miktarlarda üretilerek depolanan diğer maddeler sekonder metabolitlerdir (Croteau ve ark. 2000, Dewick, 2002)

İkincil metabolizma ürünü olarak sentezlenen moleküllerden olan sekonder metabolitler, böceklere karşı insektisit olarak, zararlı bitkilere karşı herbisit olarak, mikroorganizma ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak ve sinyal verici (haberci) olarak görev yaparlar. Bundan dolayı sekonder metabolitler “ikincil bitki ürünleri” veya “fitokimyasallar” olarak da adlandırılırlar. Bitkiler sürekli olarak çok yüksek

miktarlarda aromatik ve alifatik madde üretebilme yeteneğine sahiptir ve bu maddeler genellikle fenolik bileşikler veya oksijen ile oluşturdıkları süstitüe durumdaki yapılarıdır (Akyüz, 2007; Cordell ve ark., 2007). Sekonder metabolitlere örnek olarak fenolik bileşikler, terpenoidler, kükürtlü bileşikler ve alkaloidler verilebilir (Dewick 2002). Doğal antioksidanların büyük bir kısmı fenolik bileşiklerden meydana gelmektedir ve en önemlileri olarak fenolik asitler, flavonoidler ve tokoferoller göze çarpmaktadır.

Fenolik asitler bitkilerde yaygın olarak bulunan ve antioksidan özellik gösteren fenolik bileşik gruplarının en önemlilerinden biridir. Fenolik asitler hidroksi sinamik asit ve hidroksi benzoik asit türevlerini içeren iki gruba ayrılmaktadır (Enrique Cadenas ve Lester, 2002). Fenolik asitlerden sinamik asitin türevleri olan kafeik asit, kafeik asitin esteri olan klorojenik asit ve ferulik asit yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Spacil ve ark., 2008). Fenolik asitlerin diğer önemli üyeleri ise kafeik asit, p-hidroksi benzoik asit, 3,4-dihidroksi benzoik asit, siringik asit, vanillik asit, p-kumarik asit, sinapik asit ve rosmarinik asit olarak bilinir. Fenolik asitler bitkilerde organik asitlerle veya glikozitler ile ester bağı yapmış şekilde bulunurlar (Yanishlieva Maslarova, 2001).

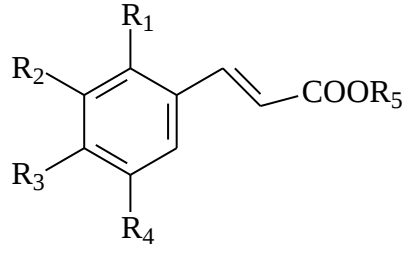
Hidroksi benzoik asitler temel olarak C₆-C₁ karbon iskeletini bulunduran, benzoik asidin türevleri olan bileşiklerdir. Hidroksi benzoik asit'in aromatik kısmının farklı karbonlarına hidroksil ve metil bağlanması ile hidroksi benzoik asitlerin farklı bileşikler oluşur. Bitkilerde en yaygın olarak bulunan hidroksi benzoik asitlere gallik asit, gentisik asit, salisilik asit, siringik asit, vanilik asit, p-hidroksi asit, protokatekuik asit ve ellajik asit örnek olarak verilebilir (Yang ve ark. 2001). Şekil 2.2'de bitkilerde çok bulunan hidroksi benzoik asitlerin yapısı gösterilmiştir.



Adı	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>p</i> -hidroksi benzoik asit	H	OH	H	H
Protokatekuikasit	OH	OH	H	H
Vanilikasit	OCH ₃	OH	H	H
Siringikasit	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
Gallik asit	OH	OH	OH	H
Salisilikasit	H	H	H	OH
Gentisik asit	OH	H	H	OH

Şekil 2.2: Bitkilerde çok bulunan hidroksi benzoik asitler (Naczki ve Shahidi, 2004).

Hidroksisinnamik asitler temel olarak C₆-C₃ fenil propankarbon iskeletini bulunduran hidroksi sennamik asidin türevleri olan bileşiklerdir. Hidroksisinnamik asitlere bitkilerde fazla miktarda rastlanmakta ayrıca glikozit ve ester gibi konjuge durumlarında da bulunmaktadır. Hidroksisinnamik asitlerin aromatik halkasına farklı konumlarda ve sayıda bağlanan hidroksil, yapıya farklı aktivite ve özellik kazandırmaktadır. Hidroksisinnamik asitler, antosiyanidinler, spermidinler, tanenler, fenilpropanoidler, stilbenler, izoflavonoidler, kumarinler, lignanlar, auronların üretildiği biyosentetik aşamada oluşurlar (Vogt, 2010). Bitkilerde yaygın olarak bulunan hidroksisinnamik asitlere *p*-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit, sinapik asit ve klorojenik asit örnek verilebilir. L-fenilalanin veya L-tirosinden yola çıkılarak *p*-kumarik asit, ferullik asit, kafeik asit, sinapik asit ve klorojenik asit meydana gelmektedir. Hidroksisinnamik asitlerin yapısında -CH=CH-COOH yapısının var olması hidrojen atomu sunabilme yeteneğini arttırmakta ve bununla birlikte hidroksi benzoik asit türevlerine göre daha etkili antioksidan özellik sergilemektedirler (Rice Evans ve ark.,1996). Şekil 2.3'te bitkilerde çok bulunan hidroksi benzoik asitlerin yapısı gösterilmiştir.



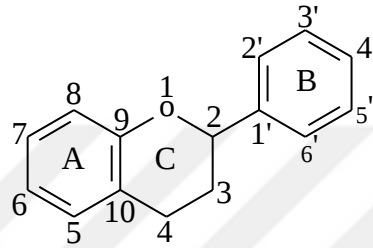
Adı	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Sinamik asit	H	H	H	H	H
o-kumarik asit	OH	H	H	H	H
m-kumarik asit	H	OH	H	H	H
p-kumarikasit	H	H	OH	H	H
Kafeik asit	H	OH	OH	H	H
Ferulik asit	H	OCH ₃	OH	H	H
Sinapik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
Klorojenik asit	H	OH	OH	H	Kuinik asit

Şekil 2.3: Bitkilerde çok bulunan hidroksi benzoik asitlerin yapısı (Naczki ve Shahidi, 2004).

Flavonoidler, bitki dünyasında en çok bulunan ve insanların çok miktarda tükettiği en kalabalık fenolik bileşik grubunu meydana getirirler. İki aromatik halkanın üç karbonlu bir alifatik zincir köprüsüyle birbirine bağlı olduğu C6-C3-C6 karbon iskeletini bulunduran difenil propanlar olarak tanımlanabilirler (Disilvestro, 2001). Flavonoidler, A, B ve C halkalarından oluşur. A ve B halkaları aromatik halkalardan, C halkası ise çok atomlu halkadan oluşur. C halkasında bulunan karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır, B halkasındaki karbon atomlarının numaralandırılmasında ise numaralarına üssü (') işaret yazılır.

Genel iskelet yapıları Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Flavonoidler hetero halka olan C halkasının yükseltgenme basamağına göre farklılık sergilemektedir (Heim ve ark., 2002). Altı karbon atomlu B halkası ile merkezde bulunan üç karbon atomlu C halkasına bağlanan hidroksil gruplarının konumu ve sayısı, C halkasının oksidasyon

derecesi ve doymamışlık düzeylerine göre gruplara ayrılırlar. Flavonoidlerin antioksidan kapasiteleri molekül yapısına göre değişmektedir. Ayrıca kimyasal yapılarındaki tüm özellikler antioksidan ve serbest radikal giderme aktivitelerini etkilemektedir (Suschetet ve ark., 1998; Saldamlı, 2005). B halkasına bağlanan hidroksil sayısının artışı göstermesiyle antioksidan özelliklerinin arttığı gözlemlenmiştir (Jovanovic ve ark., 1994).

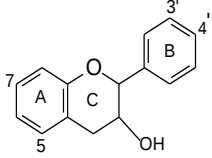
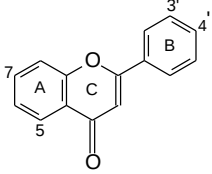
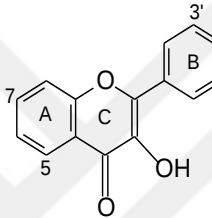
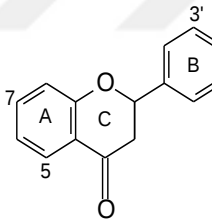
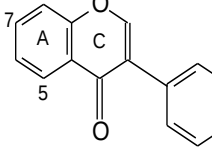
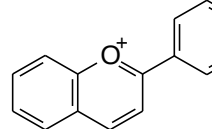


Şekil 2.4: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

Flavonoidler, oksidasyon sonucu oluşan hidroksil, peroksil, ve süperoksit anyonu serbest radikallerini gidererek antioksidan özellik gösterirler (Hu ve ark., 1995; Takahama, 1985; Husain ve ark., 1987). Bununla birlikte singlet oksijen sönmüleyici, metaller ile kelat kompleksleri oluşturduğu ve lipoksigenaz'ı temizleme etkisi yaptığı da bilinmektedir (Ávila ve ark., 2001; Ramanathan ve Das, 1993; Dohı ve ark., 1991).

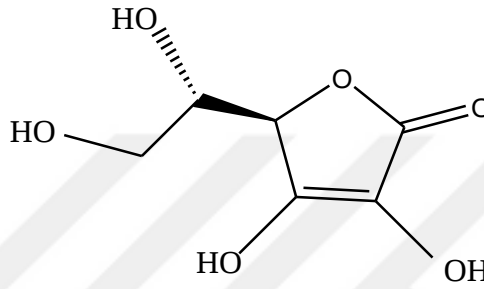
Flavonoidler, birçok bitkide ve gıdada oluşan ikincil metabolitlerin en çok bulunduğu bileşik grupları arasında yer alırlar. Flavonoidler, tat, koku ve renk gibi duyuşal özellikleri doğrudan etkilediklerinden ürünün kalitesi için büyük bir öneme sahiptirler ve bu durum, bitkilerdeki ve gıdalardaki analizleri için önem arzetmektedir (Fabre ve ark., 2001; Borbalán ve ark., 2003). Kendi arasında flavanoller, flavonlar, favonoller, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyanidinler olarak 6 farklı sınıfa ayrılmaktadır: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, sübstitüsyon modelleri ve bulunduğu kaynaklar Tablo 2.2' de gösterilmiştir.

Tablo 2.2: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, sübstitüsyon modelleri ve bulunduğu zengin kaynaklar (Heim ve ark., 2002).

Sınıfı	Genel Yapı	Adları	Sübstitüsyon Modelleri	Zengin Besin Kaynakları
Flavanol		(+)-Kateşin (-)-Epikateşin Epigallokateşin Epikateşin gallat Epigallokateşin gallat	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3',4'-OH, 3-gallat 3,5,7,3',4',5'-OH, 3-gallat	Yeşil ve siyah çay Yeşil ve siyah çay Yeşil ve siyah çay Yeşil ve siyah çay Yeşil ve siyah çay
Flavon		Krisin Apigenin Rutin Luteolin Luteolin glikozit	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoz 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glikozid	Meyve kabuğu Maydonoz, kereviz sapı domates kabuğu, turuncgiller Kırmızı biber Kırmızı biber
Flavanol		Kaempferol Kuersetin Mirisetin Morin Fisetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,7,3',4'-OH	Brokoli, greyfurt, siyah çay Soğan, brokoli, domates, çay, kırmızı şarap, mor meyveler, zeytinyağı, elma Üzüm, böğürtlen Kırmızı şarap Kırmızı şarap, mor meyveler
Flavanon		Naringin Naringenin Taksifolin Hesperidin Hesperetin	5,4'-OH, 7-ramnoglukoz 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoz 3,5,3'-OH,4'-OMe	Turuncgiller, greyfurt Turuncgiller Turuncgiller Portakal Portakal
Izoflavon		Genistin Genistein Daidzin Daidzein	5,4'-OH,7-glukoz 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glukoz 7,4'-OH	Soya fasulyesi ve fıstığı Soya fasulyesi ve fıstığı Soya fasulyesi ve fıstığı Soya fasulyesi ve fıstığı
Antosiyanidin		Apigenidin Siyanidin Malvidin	5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,4'-OH, 3', 5'-Ome	Renkli meyveler Vişne, çilek, böğürtlen Kırmızı üzüm ve şarap

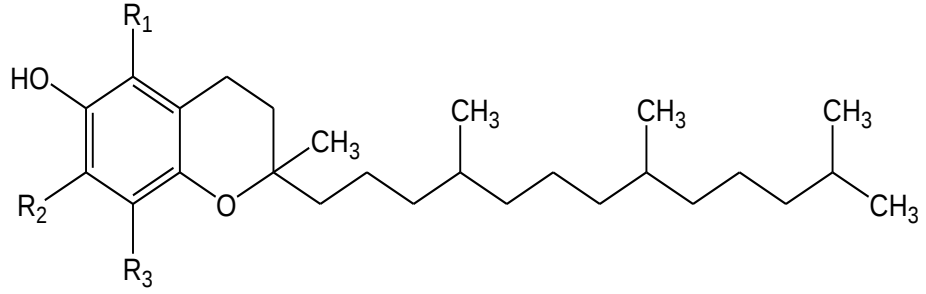
Askorbik Asit (C-Vitamiini) canlıların dışarıdan en fazla miktarda alıp kullandıkları vitamin olan askorbik asit sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunan, suda kolay bir şekilde çözünebilen, sudaki çözünürlüğü yüksek ve oluşan serbest radikalleri doğrudan

gideren etkili bir antioksidandır. C vitamini olarak da bilinen askorbik asit (Şekil 2.5) birçok gıdada ekşimeyi, acılaşmayı, renk değişimini ve bozunmayı engellemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Askorbik asit bitkilerden izole edilerek yada kimyasal olarak elde edilir (Hudson, 1990). Askorbik asit antioksidan özellik gösteren bileşiklerle beraber kullanıldığında sinerjistik etki göstererek antioksidan etkiyi arttırmaktadır (Pokorný ve ark., 2001).



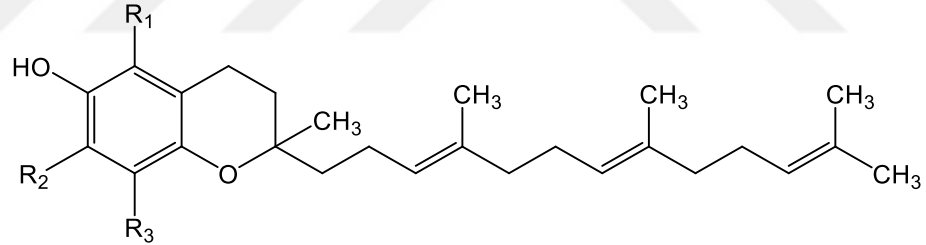
Şekil 2.5: Askorbik asidin yapısı (C vitamini).

Tokoferoller doğal bitkilerden elde edilenler içinde en çok bilinen ve en yaygın kullanılan doğal antioksidanlardır. Tokoferoller ve tokotrienoller olarak iki grupta değerlendirilirler. Doğada bu iki grubun her birinin dört izomeri (α -, β -, γ - ve δ -) olmak üzere toplam sekiz izomeri mevcuttur. Bitkisel gıdaların genelinde çok az miktarlarda da olsa bulunurlar. Bu iki grubun en önemli ve en aktif izomeri α -tokoferoldür (Shi ve ark., 2001). Tokoferoller yapılarında bulunan hidroksil grubundaki hidrojen atomunu lipid peroksil radikale vererek radikalın kararlı hale gelmesini sağlarlar ve bu şekilde antioksidan özellik gösterirler. Tokoferolden hidrojen kopmasıyla oluşan tek elektronlu radikalik yapı, tek kalan elektronunu aromatik halkada delokalize edip kararlı hale geçmektedir (Yanishlieva-Maslarova, 2001). Ayrıca α -tokoferol hidroksiperoksitlerin etkilerini yavaşlattığı belirlenmiştir. Tokoferoller sıcaklığa dayanıklı oldukları için sıcaklığın artması ile oksidasyon hızının azalmasında etkili oldukları gözlemlenmiştir (Yanishlieva Maslarova, 2001). Tokoferoller bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı sebzelerde ve meyvelerde, fındık, ceviz, süt ve yumurtada bol miktarda bulunmaktadır (Keskin ve Erkmen, 1987). Tokoferol ve tokotrienolizomerlerinin yapıları Şekil 2.6’da verilmiştir.



Tokoferoller	R ₁	R ₂	R ₃
α-Tokoferol	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
β-Tokoferol	-CH ₃	-H	-CH ₃
γ-Tokoferol	-H	-CH ₃	-CH ₃
δ-Tokoferol	-H	-H	-CH ₃

a-)Tokoferoller



Tokotrienoller	R ₁	R ₂	R ₃
α-Tokotrienol	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
β-Tokotrienol	-CH ₃	-H	-CH ₃
γ-Tokotrienol	-H	-CH ₃	-CH ₃
δ-Tokotrienol	-H	--H	-CH ₃

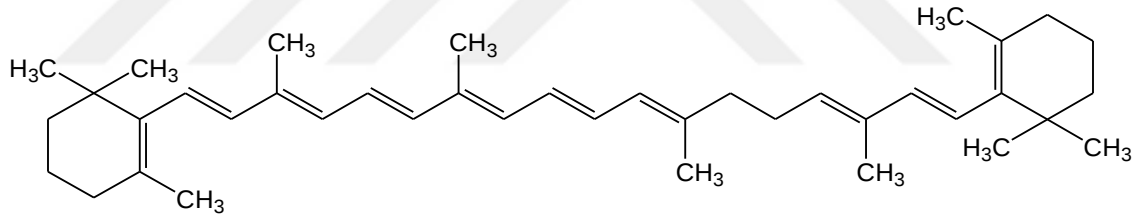
b-) Tokotrienoller

Şekil 2.6: a-) Tokoferol ve b-) tokotrienollerin izomerlerinin yapıları

Karetenoidler, bitkilerde üretilen kırmızıdan açık sarı renge kadar değişebilen bitkisel ve hayvansal dokularda depolanabilen maddelerdir. Karetenoidlerin yapılarında bulunan çift bağların konjugasyonu sonucu renkli özellik kazanırlar. Sudaki çözünürlüğü az,

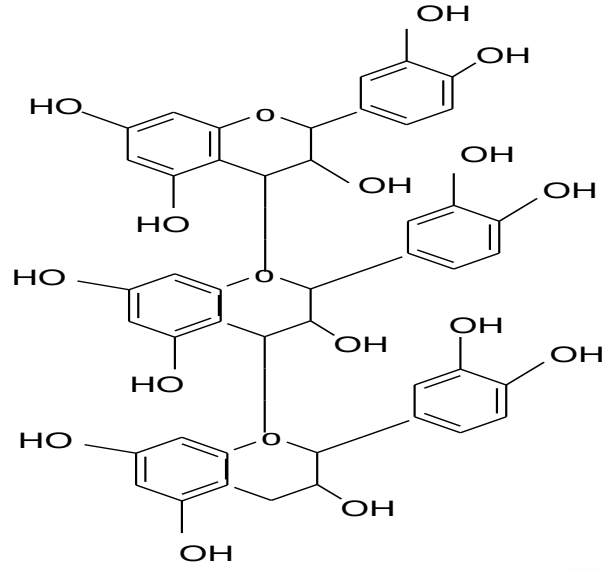
organik çözücülerde ve yağlarda çözünürlüğü yüksek olan, bitkilere çeşitli renklerini veren pigmentlerdir. Sebze, meyve ve çiçeklerin kendilerine özgü renklerinin oluşumu karotenoidler sayesinde olmaktadır. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurtanın sarısı ve renkli olan çoğu bitkide bol miktarda bulunmaktadır (Keskin ve Erkmen, 1987).

Karotenoidler, beş karbonlu izoprenoid yapının sekiz tanesinin birleşmesinden meydana gelen kırk C'lu polienlerdir. Bitkilerden ve hayvanlardan doğal olarak üretilen 670'ten fazla karotenoid türünün çoğu antioksidan özellik göstermektedir. Karotenoidlere örnek olarak β -karoten, α -karoten, likopen, lutein ve β -kriptoksantin verilebilir (Faulks ve Sauthon, 2001). Karotenoidlerden en iyi bilineni vücutta A vitaminine dönüşen β -karoten'dir. A vitamini antioksidan özellik göstermezken β -karoten (Şekil 2.7) antioksidan özellik göstermektedir (Keskin ve Erkmen, 1987).



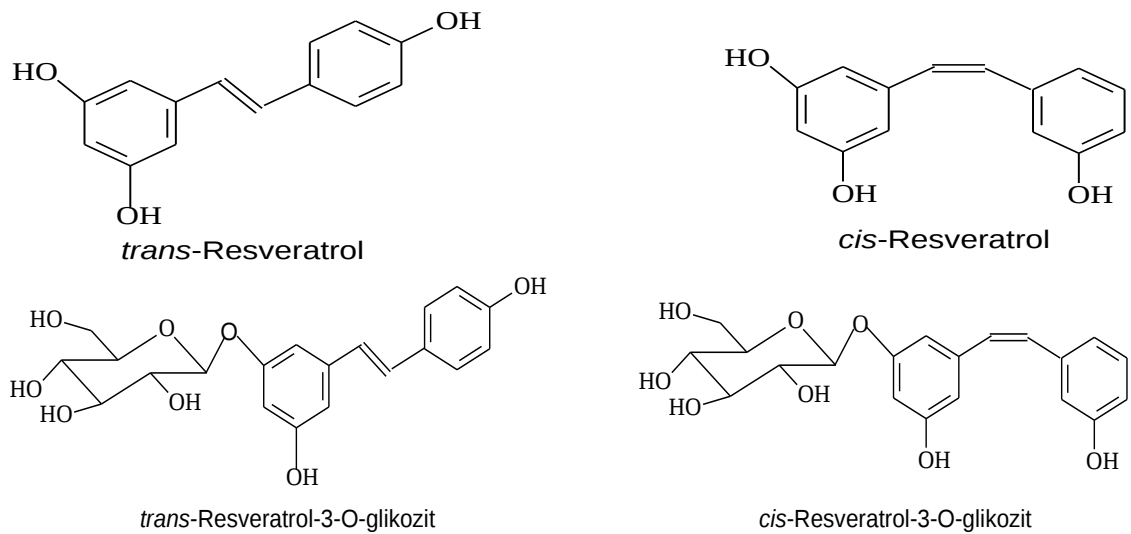
Şekil 2.7: β -karotenin yapısı

Tanenler, molekül kütleleri büyük olan polimer yapılı bileşikler olup (Şekil 2.8) yoğunlaşmış tanenler ve hidrolize tanenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Brune ve ark., 1989). Yoğunlaşmış tanenler flavonoidlerin bir araya gelerek polimerleşmesi sonucu oluşurlar (Middleton ve Chithan, 1993). Hidroliz olabilen tanenler ise gallik asit ve gallik asidin benzer yapılarının karbohidratlar ile ester oluşturmasıyla meydana gelirler (Brune ve ark., 1989). Besinsel tanenlerin en çok bilinenleri ve epikateşinin fenolik polimerleri olup renkleri koyu, tatları ekşi maddelerdir. Nar ve elma suyunda bulurlar (Enrique Cadenas ve Lester, 2002).



Şekil 2.8: Tanenlerin (Fenolik polimerler) yapısı.

Stilbenler, $C_6-C_2-C_6$ karbon iskeletine sahip polifenolik bileşiklerdir. Bitkilerin mantar, bakteri ve viral patojenlerin verdiği zararlardan kendilerini korumak için metabolizmaları tarafından sentezlenen bitki koruyucu maddelerdir. Stilbenlerin en önemli ve en yaygın bileşiği olan resveretrolün doğada cis ve trans izomerleri bulunmaktadır. Bu izomerler bitkilerde genelde glikozitleri halinde bulunur en yaygın trans-resveratol-3-O-glikozit yapısında bulunur (Şekil 2.9) (Kimura ve ark. 1985).



Şekil 2.9: Stilbenlerin yapıları: *trans*- ve *cis*- resveratrol ile glikozitleri

2.3: Toplam Fenolik Madde Tayini: Folin-Ciocalteu Metodu

Doğal gıda ürünlerinin toplam fenolik madde içeriklerinin belirlenmesi antioksidan özellik gösteren hidroksil gruplarının varlığı hakkında fikir vermesi yönünden önemlidir. Folin Ciocalteu metodu istenen numunenin toplam fenolik madde içeriklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Su ve birçok organik çözücü kullanılarak değişik ekstraksiyon teknikleri ile hazırlanmış ekstraktların bazik ortamda Folin-Ciocalteu reaktifiyle mor-menekşe renkli kompleksin 765 nm’de absorbanasının ölçülmesi temeline dayanır (Slinkart ve Singleton, 1977). Toplam fenolik madde tayini ilk olarak Singleton ve arkadaşları (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton ve ark., 1999) tarafından geliştirilmiştir.

Folin-Ciocalteu reaktifi numunelerde bulunan fenolik bileşikler ile etkileşebilmesi için sodyum karbonat ile pH yaklaşık 10’a getirilir. Fenolik bileşikler protonlarını kaybederek fenolat anyonları meydana gelir ve sarı renkli Folin-Ciocalteu reaktifini kolaylıkla indirgeyerek mor-menekşe renkli 765 nm’de maksimum absorban yapan komplekse dönüştürürler (Cao ve ark., 1993).

Genelde toplam fenolik madde içeriklerinin gallik asit standardı kullanılır ve gallik asit eş değeri türünden belirlenmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda farklı standartlarda kullanılmıştır (Prior ve ark., 2005). Bu yöntem kolay, hassas ve kesinliği yüksek olmasına rağmen asidik ortamlarda yavaş ve seçiciliği azalır. Analiz anında ekstrakte edilebilen proteinlere ile etkileşime girmesi, kolay indirgenen bileşenler ile rahat reaksiyona girmesi ve askorbik asit gibi indirgen bileşikler ile etkileşime girmesi bu metodun dezavantajlarıdır (Huang ve ark., 2005; Prior ve ark., 2005).

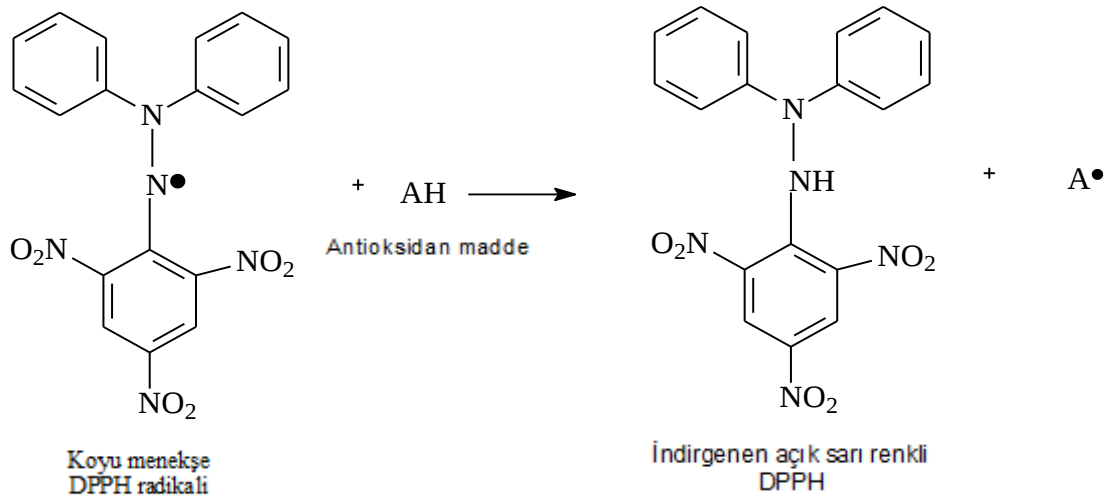
2.4. Toplam Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler

Günümüzde bitkilerin antioksidan kapasitelerini belirlemede birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler, tek elektron transferi (SET: SingleElectron Transfer), reaksiyonları üzerine dayalı yöntemler, hidrojen atomu transferi (HAT: HydrogenElectron Transfer) reaksiyonları üzerine dayalı yöntemler ve diğer mekanizmalara dayalı yöntemler olarak çeşitli sınıflara ayrılır (Prior ve ark., 2005).

2.4.1. Elektron Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

2.4.1.1. DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi

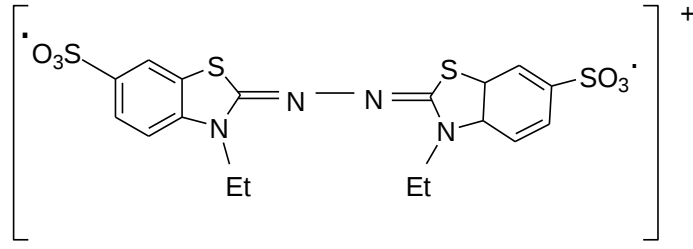
Antioksidanların radikal giderme kabiliyetini belirlemede kullanılan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 517 nm’de maksimum düzeyde absorbands gösteren kararlı bir serbest radikaldir (Sancez ve ark., 1998). Metanol veya etanol ile hazırlanmış koyu menekşe renkli DPPH radikalinin antioksidanlar ile reaksiyona girmesiyle 517 nm’deki absorbands değeri azalır ve koyu menekşe rengi açılarak sarı renkli hidrazine dönüşür. Antioksidanlar ile DPPH’nın reaksiyonu sonucu geriye kalan DPPH reaktifi ortamda var olan antioksidanların konsantrasyonu ile orantılıdır. Antioksidan, konsantrasyonu yüksek olan DPPH’ı reaksiyon şartlarına göre süpürür (Şekil 2.10). DPPH radikalinin konsantrasyonunu yarıya indiren antioksidan konsantrasyon değeri EC_{50} (veya IC_{50}) olarak ifade edilir (Prior ve ark., 2005). Bu yöntemin sağladığı en büyük avantaj basit ve hızlı bir şekilde uygulanabilir olması iken dezavantajı ise sterik engelle karşılaşılan antioksidanların DPPH ile reaksiyona girme hızının azalabilmesidir (Sanchezve ark., 1998)



Şekil 2.10: Antioksidan-DPPH radikali tepkime mekanizması

2.4.1.2. ABTS Yöntemi / TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)

Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK) olarak tanımlanan ABTS yöntemi Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Miller ve ark., 1993).. Radikalik bir katyon olarak kullanılan 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) (Şekil 2.11) absorbansının proton (H^+) veren antioksidanlar tarafından inhibe edilmesi esasına dayanır. Toplam antioksidan kapasite trolokseşdeğeri cinsinden ifade edilir. Miller ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu orijinal yöntemde, $ABTS^+$ katyonu metmiyoglobinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ile aktive olduktan sonra oluşan ferrilmiyoglobinradikal türlerinin ABTS molekülü ile 10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonucunda oluşturulur. Bu radikal çözeltisinin antioksidanlarla reaksiyonu sonucu renginde açılma gerçekleşir ve bu durum 405 veya 734 nm'de maksimum absorbans değişimi olarak izlenir (Miller ve ark., 1993; Miller ve Rice-Evans, 1994).

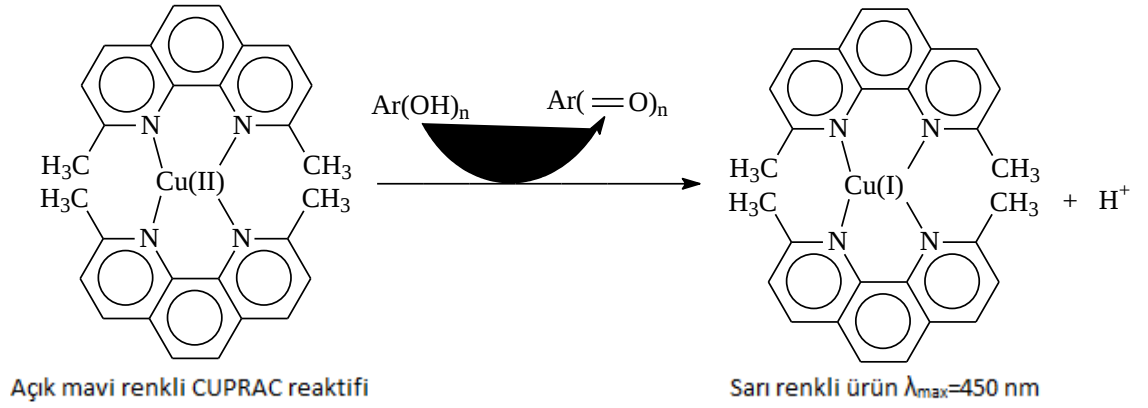


Şekil 2.11: ABTS^{•+} katyonunun yapısı

Re ve arkadaşları, (1999) tarafından geliştirilen bir diğer yöntemde ise, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu reaksiyonunda ABTS^{•+} radikal katyonu meydana gelmektedir. ABTS^{•+} radikal oluşum reaksiyonunda çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletilir. Oluşan ABTS^{•+} radikal katyonu oda sıcaklığında ve ışıksız ortamda 2 gün bozunmadan kalabilir. Modifiye edilen bu yöntemin ilk yöntemle göre farklılığı hem lipofilik hemde hidrofilik antioksidan analizleri için uygulanabilmesi ve bir renk giderimi yöntemi olarak kullanılabilmesidir (Re ve ark., 1999).

2.4.1.3. Cu(II) İyonu indirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi

Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemde reaksiyon, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu Cu(II)-Nc kompleksinin antioksidanlarla reaksiyona girerek Cu(I)-Nc kompleksine dönüşmesi şeklinde meydana gelmektedir. (Şekil 2.12). Bu dönüşümde bakırın indirgenmesinden yararlanılır. Cu(II)-Nc kompleksinin açık mavi renginin, bakırın indirgenmesiyle oluşan Cu(I)-Nc kompleksinin açık sarı rengine dönüşümünün 450 nm'de izlenmesiyle antioksidan kapasite belirlenmektedir. Bu özellikten dolayı metoda 'Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite' yöntemi denilmiş ve kısaca CUPRAC yöntemi olarak isimlendirilmiştir (Apak ve ark., 2004).



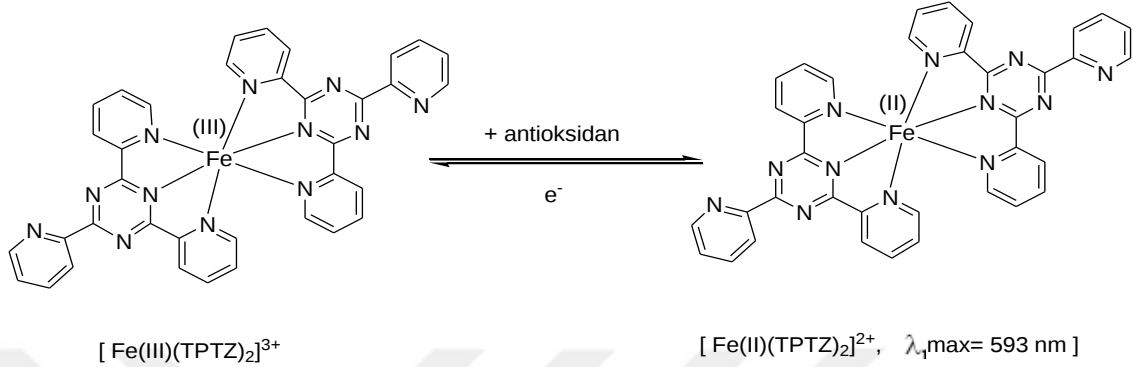
Şekil 2.12: Cu(II)'nin antioksidan madde (Ar(OH)_n) ile Cu (I)'e indirgenmesi.

Bu yöntemde, suda hazırlanan Cu(II) klorür, % 96'lık etanolde hazırlanan Nc ve suda hazırlanan amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltileri belirli hacimlerde karıştırıldıktan sonra analiz edilecek olan antioksidan çözeltisinden de belirli miktar ilave edilir ve 30 dakikalık bir inkübasyon süresi uygulanır. Daha sonra bu karışım çözeltisinin absorbansı, içinde antioksidan olmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'de ölçülür. Gallik asit, kuersetin, askorbik asit gibi antioksidan özellik gösteren maddelerin reaksiyonu kısa sürede gerçekleşirken, naringin, naringenin gibi antioksidan özellik gösteren maddelerin reaksiyonu yavaş gerçekleşir reaksiyonları hızlandırmak için sıcaklığın 50°C'ye çıkartılıp 20 dakika beklenmesi yeterli olmaktadır (Apak ve ark., 2004).

2.4.1.4. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Metodu

Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen bu yöntemde indirgeme gücü dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini belirtmektedir. Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye indirgenmesiyle meydana gelen renk değişiminin 593-595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlenmesi şeklinde uygulanır. Yöntemin Benzie ve Strain (1996, 1999) tarafından modifiye edilen şeklinde, renksiz Fe³⁺-tripridiltiazin([Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺) kompleksi, asidik ortamda (pH=3,6) antioksidanlar ile reaksiyon sonucu indirgenerek mavi renkli Fe²⁺-tripridiltiazin [Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺ kompleksine dönüşmektedir (Şekil 2.13). Oluşan

bukompleksi içeren çözeltinin spektrofotometrede 593-595 nm’de absorbansının ölçülmesiyle antioksidan maddelerin indirgenme gücü toplam olarak belirlenmektedir (Benzie ve Strain, 1996; Benzie ve Strain, 1999).



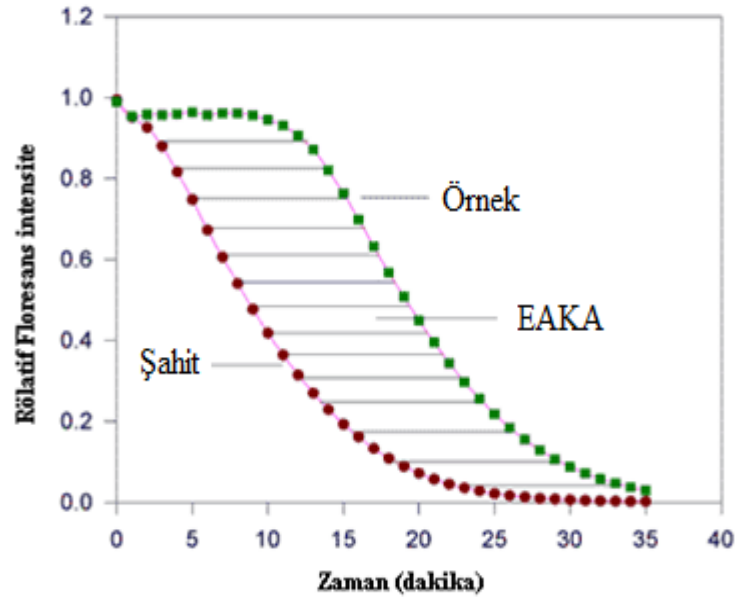
Şekil 2.13: $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ kompleksinin antioksidan ile etkileşimi sonucu $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ kompleks oluşumu.

2.4.2. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

2.4.2.1. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

İlk olarak Cao ve çalışma arkadaşları (1993) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde 2,2'-azobis (2-amidino propan) dihidroklorür (AAPH) peroksil radikalini, Cu(II)-H₂O₂ ise hidroksil radikalini oluşturmak için kullanılmaktadır. Yükseltgenebilen bir protein olan β-fikoeritrin (β-PE) ise ortamdaki floresans şiddeti değişiminin izlenmesi için kullanılmaktadır. Analizde serbest radikal ile β-PE'nin arasındaki reaksiyonun oluşturduğu floresans azalmasının şiddetini peroksil radikalın vermiş olduğu hasarın derecesini belirlemektedir. Ortama antioksidanlar konduğunda ise radikal türler inhibisyona uğrayacağından floresanstaki düşüş yavaşlamaktadır. Bu iki durum arasındaki floresans miktarı farkı kullanılarak toplam antioksidan kapasite belirlenmektedir. β-PE floresansının zamanla azalması doğrusal değil, üsteldir. Bu nedenle floresans miktarının belirlenmesinde bu eğri altında kalan alan (EAKA)

kullanılır. Eğri altında kalan alanın hesabı, reaktif türlerin antioksidanlar tarafından inhibe edilme sürelerini de içeren bir inhibisyon yüzdesi verir. EAKA değerindeki net değişim, toplam antioksidan kapasiteyle doğru orantılıdır (şekil 2.14) (Cao ve ark., 1993).



Şekil 2.14: Analiz edilen örnek ile şahit çözeltisi eğrileri altında kalan alan (EAKA) farkı olarak ifade edilen antioksidan aktivitesi.

2.4.2.2. Krosin Ağartma Yöntemi

Tubaro ve arkadaşları (1998), tarafından geliştirilmiştir. Yöntem, sıcaklığın etkisiyle AAPH'nin ürettiği peroksil radikalının, suda çözünebilir renkli bir karotenoid olan krosin'i yükseltgemesi sonucunda renginin ağarması temeline dayanmaktadır (Tubaro ve ark., 1998). Yöntemde krosinin renginin ağarma derecesi hesaplanmaktadır (Prior ve Cao, 1999). Hazırlanan çözeltiye ilave edilen antioksidanları içeren ekstrakt, ağarmayı önlemektedir. Fosfat tamponunda hazırlanan krosin ve konsantrasyonu bilinen antioksidan çözeltileri ile reaksiyon gerçekleştirilir (Huang ve ark., 2005).

2.4.2.3. Toplam Radikal Tutma Parametresi (TRAP) Yöntemi

TRAP yöntemi ilk olarak Wayner ve arkadaşları (1985) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem çoğunlukla serum veya plazmanın toplam antioksidan içeriklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Temel reaksiyon ORAC yöntemindekine benzemektedir. Yöntemde 2,2'-azobis (2-amidino propan) dihidroklorür (AAPH) peroksil radikallerini oluşturmak için kullanılır. Analizi gerçekleştirilecek olan plazmaya AAPH ilave edilmesiyle yükseltgenecek bileşenlerin oksidasyonu için gereken oksijenin ölçülmesi esasına dayanır. Eğer plazmada antioksidanlar bulunursa oksidasyon reaksiyonu yavaş gerçekleşir. Reaksiyonda gerçekleşen gecikme zamanı ölçülür ve analiz edilen plazmanın toplam antioksidan kapasitesi, troloks (6-hidroksil-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit) standardı kullanıldığında elde edilen gecikme zamanıyla karşılaştırılarak troloks eşdeğeri türünden verilir (Wayner ve ark., 1985).

2.4.2.4. Luminol Yöntemi

TRAP yönteminin ilerleyen zamanlarda Alho ve Leinonen (1999), tarafından geliştirilmesiyle ortaya çıkan yeni bir yöntemdir. AAPH'den oluşan peroksil radikallerinin luminol bileşiğini oksidasyona uğratarak yükseltgemesiyle ışık yayan luminol radikalleri meydana gelmektedir. Yayılan bu emisyon luminometre ile ölçülmektedir. Luminol radikallerini içeren karışıma antioksidan bir madde eklendiğinde kemiluminesans ışımasının oluşumunu belirli bir süre geciktirir. Bu gecikme zamanı numunede bulunan toplam antioksidan miktarı ile doğru orantılıdır. Gerçekleştirilen analizde sonuçlar troloks eşdeğeri türünden belirlenir (Alho ve Leinonen, 1999).

2.4.2.5. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi

Bu yöntem, TRAP yönteminin çalışma sisteminden yararlanılarak Valkonen ve Kuusi (1997) tarafından geliştirilmiştir. Yöntemde peroksil radikali oluşturmak için AAPH, yükseltgenen substrat olarak da Diklorofloresein-diasetat (DCFH-DA) kullanılır. Oluşan peroksil radikalının DCFH-DA'yı okside etmesi sonucu yüksek floresans özellik gösteren diklorofloresein (DCF)'e oluşur. DCF 480 nm'de uyarılıp, 526 nm'de emisyon yapar. 504nm'de absorpsiyon göstermektedir. Yöntemde toplam antioksidan kapasite iki adımda gerçekleştirilir. İlk işlemde, numunede bulunan antioksidanların kapasitesi gecikme zamanı türünden belirlenir, ikinci adımda aynı numuneye konsantrasyonu bilinen troloks çözeltisi eklenir. Karışımda bulunan troloks serbest radikaller tarafından bitirildikten sonra ikinci gecikme zamanı tespit edilir. İlk ve ikinci adımda belirlenen gecikme zamanları arasında oluşan fark kullanılarak troloks türünden toplam antioksidan kapasite hesaplanır (Valkonen ve Kuusi, 1997).

2.5. Bitkisel Kaynaklardan Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler

Bitkisel materyallerden işlevsel bileşenlerin ekstaksiyonu önemli bir işlemdir ve bu konuda çeşitli teknikler kullanılmaya başlamıştır (Spigno ve ark., 2007). Ekstraksiyon, fenolik bileşiklerin izolasyonu, tanımlanması ve kullanımında önemli bir adımdır (Stevigny ve ark., 2007).

Fenolik bileşikler basit yapılı küçük moleküllerden polimer yapılı büyük moleküllere kadar farklılık gösterir. Bitkisel kaynaklarda bulunan fenolik bileşikler karbonhidratlar, proteinler ve birçok bileşenlerle birlikte kompleks halinde olabilirler ve büyük molekül kütleli fenolik bileşiklerin oluşturduğu kompleks yapıların çözünürlüğü çok düşük olabilir.

Fenolik bileşiklerin çözünürlüğü, kullanılan çözücünün türüne (polaritesine), fenolik bileşiklerin polimerleşme derecesinin yanı sıra fenolik bileşiklerin diğer gıda bileşenleri ile etkileşimlerine ve çözünmeyen komplekslerin yapısına bağlıdır. Bu nedenle bitkisel kaynaklardan tüm fenolik bileşiklerin tamamen ekstrakte edilmesi mümkün değildir. Metanol, etanol, aseton, su, etil asetat ve az miktarda propanol, dimetilformamid ve bu çözücülerin farklı oranlardaki karışımları fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılır (Naczki ve Shahidi, 2004). Bununla birlikte fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda uygulanacak olan ekstraksiyon tekniği de önem kazanmaktadır.

Bitkisel kaynaklardan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılan geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin uzun sürede gerçekleşmesi, yorucu olmaları, ekstraksiyon seçiciliğinin ve verimin düşük olması, çok miktarda zararlı çözücülerin kullanılması gibi olumsuzlukları vardır (Ghafoor ve ark., 2009). Bunun yanı sıra organik çözücüler ile geleneksel katı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleşirken istenmeyen kalıntılar oluşabilir ve ekstrakt çözücünün uzaklaştırılması sırasında oksidatif dönüşümlere uğrayabilir (Díaz-Reinoso ve ark., 2006). Yıllardır kullanılan Soxhlet ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemler çok zaman alır ve nispeten büyük miktarlarda çözücü gerektirir (Luque de Castro ve Garcia-Ayuso, 1998). Bu nedenle kısaltılmış ekstraksiyon süresi, azaltılmış organik çözücü tüketimi, ekstraksiyon veriminin artırılması ve kirliliği önleme özelliklerine sahip yeni ekstraksiyon teknikleri için artan bir talep vardır (Wang ve Weller, 2006).

Son zamanlarda bitkisel kaynaklardan bir çok maddenin hızlı ve etkili ekstraksiyonu için geleneksel ekstraksiyon türlerinin yerine ultrason destekli ekstraksiyon (Vinatoru, 2001), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (Kaufmann ve Christen, 2002; Smith, 2002), mikrodalga destekli ekstraksiyon (Kaufmann ve Christen, 2002) ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Marr ve Gamse, 2000; Lang ve Wai, 2001; Meireles, 2003) gibi yeni ekstraksiyon teknikleri kullanılmaya başlamıştır.

2.5. 1. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Klasik çözücü ekstraksiyonu katı-sıvı ekstraksiyonu olarak da bilinir. Katı fazda bulunan hedef bileşenin bir sıvının çözünürlük özelliklerini kullanarak ayrılması işlemidir. Katı faz ile sıvı faz belirli bir süre etkileştirildikten sonra bu fazlar birbirinden uygun bir yöntem ile ayrılır. Ekstraksiyon esnasında katı fazdan sıvı faza madde geçişi üç aşamada gerçekleşmektedir: (1) çözücü olarak kullanılan sıvı faz katı faza temas ederek istenilen bileşeni çözer, (2) çözünen bileşen katı faz içinde yüzeye difüze olur, (3) çözünen bileşen çözelti ortamına aktarılır. Ekstraksiyonda sıcaklık, zaman, yüzey alanı, istenilen bileşenin çözünürlüğü, çözücü viskozitesi ve akış oranı gibi parametreler ekstraksiyon verimini ve tekrarlanabilirliğini etkiler (Fellows, 2009). Klasik çözücü ekstraksiyonu kullanılarak bitkisel materyallerden fenolik bileşiklerin elde edilmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu ekstraksiyon yöntemi ile yapılan bazı çalışma örnekleri incelenecek olursa;

İnanç ve Yüksel (2018), ıhlamur bitkisinin (*Tilia cordata*) katı-sıvı ekstraksiyonunda toplam fenolik madde kinetiğinin matematiksel modellenmesi ile ilgili çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada 5 farklı sıcaklıkta (60, 70, 80, 90 ve 100 °C) demlenen ıhlamur bitkisinin katı-sıvı ekstraksiyonunda polifenollerin sıvı faza geçme süreleri incelenmiştir. Toplam fenolik bileşiklerin katı-sıvı ekstraksiyonunun matematiksel modellemesinde Fick yasasının uyarlanmış hali kullanılmıştır. Ihlamur bitkisinin (*Tilia cordata*) çayı geleneksel yöntemle hazırlanmıştır. Örneklerin toplam fenolik bileşikleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiş ve gallik asit eşdeğerleri (GAE) mg/ml olarak ifade edilmiştir. Katı-sıvı faz ıhlamur ekstraksiyon uygulama sonrası bütün sıcaklıklardaki toplam fenolik madde miktarlarının denge konsantrasyonları 40.5-43 mg/L arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

Karacabey ve Mazza (2008), öğütülmüş üzüm kamışlarından trans-resveratrol, trans-viniferin, ferulik asit ve toplam fenolikler için katı-sıvı ekstraksiyon koşullarının optimizasyonunu araştırmışlardır. Sıcaklık ve etanol konsantrasyonunun tüm cevapları için ana işlem değişkenleri olduğu bulunmasına karşın çözücünün katıya oranı, çalışılan

cevapların hiçbirini için anlamlı bulmamışlardır. Transresveratrol, trans-viniferin ve toplam fenoliklerin verimleri sıcaklık arttıkça yükseldiğini tespit etmişlerdir. Transresveratrol (4,25 mg / g dw), trans--viniferin (2,03 mg / g) ve toplam fenolikler (9,28 mg / g dw) için en yüksek verim, orta dereceli bir etanol konsantrasyonunun (% 50-70) ve en yüksek sıcaklık (83,6 °C) birleşiminden elde edilirken, ferulik asidin (1,05 mg / g dw) ekstraksiyonu için en uygun koşulların çalışılan en düşük sıcaklıkta (16,4 °C) ve % 35'lik bir etanol konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Farklı ekstraksiyon koşulları için D_{eff} , deney sonuçları Fick'in ikinci yasasından türetilen bir modele uyarlayarak hesaplamışlardır. Resveratrolün katı fazda etkili difüzivitesi değişen ekstraksiyon koşullarında $3,1 \times 10^{-13}$ - $26,6 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Resveratrolün etkin difüzivitesindeki artış, sıcaklık arttıkça gözlemlendi ve öngörülen en yüksek seviye, 83,6 °C'de % 54 etanol / su karışımı kullanıldığında elde edildiğini belirlenmiştir. Etanol konsantrasyonundaki artış, % 50-55'e kadar olumlu bir etki sergilemiş bu noktadan sonra konsantrasyondaki artış ile etkin difüziviteyi düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

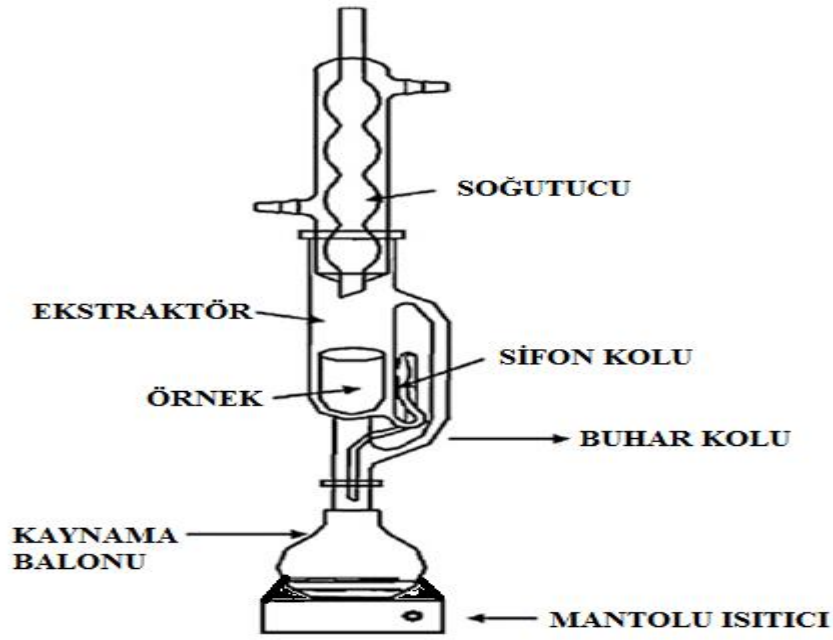
Alberti ve arkadaşları (2014), cevap yüzeyi metodolojisi (RSM) yöntemini kullanarak elmadan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu optimize etmişlerdir. Çözücü oranı (metanol veya aseton), sıcaklık ve zaman gibi parametrelerin toplam flavonoidler, antioksidan kapasite (FRAP ve DPPH) ve toplam fenolik içeriklerin ekstraksiyonu üzerindeki etkilerini analiz etmek için bir Boxn Behnken tasarımı yapmışlardır. Fenoliklerin tanımlanma analizlerini optimum ekstraksiyon koşullarında HPLC yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. En uygun ekstraksiyon koşulları % 84 metanol ile 28 °C'de 15 dakika ekstraksiyon ve % 65 aseton ile 10 °C'de 20 dakika ekstraksiyon olarak kaydetmişlerdir. Aseton çözeltileri kullanılarak yapılan deneylerin birçoğunda daha fazla biyoaktif bileşik elde edilmiştir, bu deney sonuçlarından yola çıkılarak asetonla elde edilen ekstraktların daha fazla antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür. Fakat metanol kullanılarak yapılan ekstraksiyonda klorojenik asit (%32,4) ve floridzin (% 48,4) daha yüksek verim ile elde edilmiştir.

Başka bir çalışmada Weidner ve arkadaşları (2012) tarafından, üç yabancı üzüm (*Vitis californica*, *Vitis riparia* ve *Vitis amurensis*) türünün tohumları bir kahve değirmeni içinde öğütüldü ve 6-8 saat boyunca bir Soxhlet aparatında heksan ile yıkandı. Daha sonra yıkanan örnekler bir erlenmayerde katı madde/ çözücü oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde %80 metanol veya %80 aseton çözeltileri kullanılarak çalkalamalı su banyosunda 50 °C 'de 30 dakika süresince fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Fenolik bileşiklerin toplam içeriği Folin-Ciocalteu fenol reaktifi kullanılarak belirlenirken, tanenlerin içeriği vanilin ve BSA çökeltme yöntemleri kullanılmıştır. Ek olarak, DPPH serbest radikal temizleme aktivitesiyle ekstraktların indirgeme gücü ölçülmüştür. Ekstrelerdeki fenolik asitler ve kateşinler gibi fenolik bileşikleri tanımlamak için RP-HPLC yöntemini uygulamışlardır. Tohumların büyük miktarda tanin, kateşin ve gallik asit ve gözlenebilir miktarlarda *p*-kumarik asit içerdiği belirlemişlerdir. Fenolik bileşiklerin toplam içeriği ve taninlerin *V. californica* ve *V. riparia* tohumlarından elde edilen ekstraktlarla benzer olduğu ortaya konmuştur. Bununla birlikte, *V. californica* ve *V. riparia* tohumlarından elde edilen özütlerdeki toplam fenolik bileşikler ve tanenlerin toplam içeriğinin, *V. amurensis* tohumlarından elde edilenlerden iki kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Amerikan türlerinin tohumlarından (*V. californica* ve *V. riparia*) elde edilen ekstraktların benzer şekilde yüksek tanen konsantrasyonları içermesine karşın *V. amurensis* tohumlarından elde edilen özütlerin bu bileşiklerin yaklaşık yarısına sahip olduğunu kaydetmişlerdir. Kateşin ve epicatechin içeriğinin tüm ekstraktlarda benzer olduğunu ortaya koymuşlardır. En yüksek DPPH ' anti-radikal temizleme aktivitesi, *V. californica* ve *V. riparia* tohumlarının asetonlu ve metanollü ekstraktlarda olduğu; *V. californica* tohumlarından elde edilen asetonlu ekstraktın, en güçlü indirgeyici olduğunu belirlemişlerdir.

2.5. 2. Soxhlet Ekstraksiyonu (SE)

Soxhlet ekstraksiyonu ilk kez 1897 yılında Alman kimyacı Franz Ritter von Soxhlet tarafından sütteki yağ miktarını belirlemek için kullanmıştır. Bir asırdan fazla süredir kullanılan Soxhlet ekstraksiyonu standart bir yöntemdir ve yeni ekstrasyon

ölçümlerinde referans olarak kullanılır (Luque de Castro ve Priego-Capote, 2010). Soxhlet ekstraksiyonu genellikle katı ve yarı katı örneklerin ekstraksiyonu için kullanılan bir tekniktir. Soxhlet ekstraktörü özel bir düzenek tasarlanarak camdan üretilen bir sistemdir. Şekil 2.15’de gösterilen geleneksel Soxhlet ekstraktörü sistemi, mantolu ısıtıcı, kaynama balonu, sifon kolu (çözücü akış borusu), ekstraktör, selüloz örnek kartuşu ve soğutucudan oluşmaktadır.



Şekil 2.15: Geneleksel Soxhlet ekstraktörü (Luque de Castro ve Priego-Capote, 2010).

Ekstraksiyonu yapılacak örnek selülozdan yapılmış filtre görevi gören kartuşun içine alınarak ekstraktör hazinesine yerleştirilir. Kaynama balonuna konulan çözücü veya çözücü karışımı, bir mantolu ısıtıcı yardımı ile ısıtılarak çözücü buharlaşır. Buhar kolundan yukarı ilerleyen çözücü buharları soğutucuya ulaştığında yoğunlaşarak kartuştaki örneğin üzerine damlayarak örnek çözücü ile ıslanır. Ekstraksiyon hazinesindeki çözücü seviyesi yükselerek sifon kolunun tepesine ulaştığında çözücü, sifon oluşarak ekstraksiyon hazinesinden kaynama balonuna akar. Ekstraksiyonda gerçekleşen bu döngü ekstraksiyon hazinesine dolan çözücü renksiz oluncaya kadar

sürekli devam eder. Ekstraksiyon hazinesinde ekstrakte edilen hedef bileşenler çözücüde çözünür ve sifon gerçekleştiğinde çözücü ve hedef bileşen kaynama balonuna geçer. Kaynama balonunda sadece temiz çözücü buharlaştığı için hedef bileşen tekrardan döngüye katılmaz bu nedenle her döngüde temiz çözücü kullanılır.

Geleneksel Soxhlet ekstraksiyon yönteminin bazı önemli avantajları vardır. Ekstraksiyon döngüsünde temiz çözücü kullanıldığından dolayı Soxhlet ekstaktörüyle yapılan ekstraksiyonun verimi daha yüksek olmaktadır. Verimin yüksek olması Soxhlet ekstraksiyon tekniğinin en önemli özelliğidir. Ayrıca, kaynama balonuna uygulanan ısıнын, bir miktarının ekstraksiyon hazinesine ulaşması nedeniyle sistem genellikle yüksek bir sıcaklıkta kalır. Numune süzgeç kağıdından yapılmış bir kartuşa konulduğu için ek olarak filtrasyona ihtiyaç duyulmaz. Soxhlet ekstraksiyon yönteminde kullanılan ekipmanların maliyeti düşük olduğundan ucuz bir yöntemdir. Soxhlet ekstraksiyonun en son alternatifleri (mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, vb.) göz önüne alındığında, bu yöntemle daha fazla ekstrakt elde edilebilir (Luque de Castro ve Garcia-Ayuso, 1998). Soxhlet ekstraksiyon metodunda kolaylıkla buharlaşabilen çözücüler kullanıldığından dolayı hedef bileşen ile çözücü birbirinden kolaylıkla ayrılmaktadırlar.

Bu tekniğin dezavantajları, ekstraksiyonda kullanılan çözücü miktarının fazla olması ve ekstraksiyonun süresinin oldukça uzun olmasıdır. Soxhlet ekstraksiyonunda fazla miktarda çözücü kullanılması maliyeti arttırmakta ve çevreye önemli derecede zarar vermektedir. Ayrıca, numuneler çözücünün kaynama noktasında uzun süre ekstrakte edilir ve bu da hedef bileşenlerin termal olarak bozunmasına sebep olur (Luque de Castro ve Priego-Capote, 2010). Soxhlet ekstraksiyon yöntemine dayalı numuneyi hazırlama aşamasını içeren farklı birçok resmi yöntem vardır (US EPA Method 8100, 1986; US EPA Method 3540, 1995; AOAC Method 963.15, 1990; British Standard, BS 4267, 1991; ISO 659-1988 (E), 1988).

Günümüze kadar Soxhlet ekstraksiyonu ile bitkisel kaynaklardan fenolik maddelerin ekstraksiyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalara bakacak olursak; Baydar ve arkadaşları (2004) yaptığı çalışmada üzümlerin (*Vitis vinifera* L.) bozuk olmayan ve hastaliksız meyvelerini seçip toplandıktan sonra tüm çekirdekleri meyvelerden elle ayırmışlardır. Daha sonra birbirinden ayrılan üzüm çekirdekleri ve meyvesini ayrı ayrı nemi giderilene kadar 70 °C'de 72 saat kurutulduktan sonra bir öğütücü ile ince toz haline getirmişlerdir.

Toz haline getirilmiş üzüm çekirdeği tohumlarının (100 g), yağının uzaklaştırmak için petrol eteri ile (6 saat boyunca 60 °C'de) Soxhlet ekstraktörü kullanarak ekstrakte etmişlerdir. Yağı uzaklaştırılmış üzüm çekirdeği tozunu, bir Soxhlet ekstraktöründe 8 saat boyunca 200 mL aseton: su: asetik asit (90: 9,5: 0,5) çözücü karışımında 60 ° C'de ekstrakte etmişlerdir. Ayrıca, farklı çözücü kullanarak Soxhlet ekstraktöründe 60 °C'de 8 saat boyunca 200 mL etil asetat: metanol: su karışımını (60:30:10) çözücü karışımı kullanarak ekstrakt elde etmişlerdir. Toz haline getirilmiş ve yağı uzaklaştırılmış çekirdeksiz üzüm meyvelerini (100 g), bir Soxhlet cihazında, 8 saat boyunca 200 mL etil asetat: metanol: su (60:30:10) çözücü karışımında 60 ° C'de ve mutlak etanol: su (95: 5) çözücü karışımında, 70 °C'de ekstrakte etmişlerdir. Vakum altında 70 °C'de döner buharlaştırıcı kullanılarak çözücünün uzaklaştırılmasının ardından ham ekstraktlar elde etmişlerdir.

Üzüm çekirdeklerinin Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak aseton:su:asetik asit (90:9.5:0,5) karışımı kullanıldığında ekstraksiyon verimi % 15,31 (a/a), Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile 667,87 mg GAE/g toplam fenolik madde miktarı değeri elde etmişlerdir. Çözücü olarak etil asetat: metanol: su (60:30:10) karışımı kullanıldığında ekstraksiyon verimi % 16,21 (a/a), Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile 667,87 mg GAE/g toplam fenolik madde miktarı değeri elde etmişlerdir. Çekirdeksiz üzüm meyvelerinin Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak etil asetat: metanol: su (60:30:10) karışımı kullanıldığında ekstraksiyon verimi % 6,36 (a/a), Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile 45,44 mg GAE/g toplam fenolik madde miktarı değeri elde etmişlerdir.

Çözücü olarak ve mutlak etanol: su (95:5) karışımını kullanıldığında ekstraksiyon verimi % 7,11 (a/a), Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile 29,55 mg GAE/g toplam fenolik madde miktarı değeri elde etmişlerdir.

Alara ve arkadaşları (2018), *Vernonia Cinerea* yapraklarından fenolik bileşiklerin Soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilmesini incelemişlerdir. Ekstraksiyon süresinin (1-4 saat), katı numune/çözücü oranı (1:10–1:25 g/mL) ve etanol konsantrasyonunun (% 20-80 h/h) ekstrakt verimi, toplam fenolik içeriği üzerindeki etkileri ve toplam flavonoid içeriğini araştırmışlardır. Ayrıca, maksimum koşullarda elde edilen ekstraktaki fenolik bileşikler ve fonksiyonel gruplar LC-Q-TOF-MS ve FT-IR kullanılarak tanımlamışlardır. Bununla birlikte elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerini de incelemişlerdir. Deney sonuçları en yüksek ekstrakt veriminin (% 10,01 $\pm$ 0,85 a/a), toplam fenolik içeriği (53,96 $\pm$ 1,45 mg GAE/g dw) ve flavonoid içeriği (30,09 $\pm$ 0,44 mg QE/g dw) 2 saat ekstraksiyon süresi, katı numune/çözücü oranı 1:20 g/mL ve % 60 v/v etanol konsantrasyonu kullanılarak elde edildiğini göstermiştir.

2.5. 3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UDE)

Ses dalgası türleri, frekanslarına göre gruplandırılırlar. İnsan kulağı 20Hz ile 20 kHz arasındaki frekanstaki sesleri duyabilmektedir. Ultrason 20 kHz'den büyük frekanslarda olan ses dalgalarıdır. Gıda sanayinde gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan ultrason 20 kHz ile 1MHz frekans aralığındadır. 1 MHz üzeri ultrason uygulamaları genellikle tıp ve medikal görüntüleme alanında kullanılmaktadır (Chemat ve ark., 2008; Feng ve ark., 2011). Ultrasonik destekli ekstraksiyon, ses dalgası destekli ekstraksiyon olarak da bilinir. Ultrasonik dalgaları sıvının içine uygulandığında boşluk (kavitasyon) oluşumu gerçekleşir. Oluşan bu boşluklar sıvı ortamında çok sayıda küçük kabarcıklar meydana getirir ve katılara uygulandığında küçük parçaların kopmasına neden olur (Chandrasekaran ve ark., 2003).

Ultrasonik dalgaların bir sıvı çözücünde oluşturmuş olduğu boşluklar veya kabarcıklar ilk defa oluştuktan sonra basınç kritik değerin altına düşer. Basınçta salınım sonucu sıkışma anında en yüksek değere ulaştığında oluşan boşluklarının birçoğunun çökmesiyle yüksek bir enerji açığa çıkarak şok dalgaları ve mikro- jetler meydana gelir (Neduzhii, 1962; Lauterborn ve Ohl, 1997). Şok dalgalarının ve mikro jetlerin oluşmasıyla ekstraksiyon anında hücre çeperleri parçalanarak, dokuda var olan hedef maddelerin rahatlıkla ekstrakte edilmesi sağlanabilir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sırasında çözücüye ekstrakte edilebilir maddelerin geçmesi etkin bir şekilde gerçekleşir (Vinatoru, 2001). Ultrasonik destekli ekstraksiyon istenilen biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Numunelere uygulanan ultrasonik dalgaların etkisiyle ekstraksiyon verimi, hücre çeperinin parçalanması, parçacık boyutunun küçülmesi ve meydana gelen kavitasyon kabarcıklarının oluşturduğu kütle aktarımı ile ilişkilidir (Paniwnyk ve ark. 2001).

Ultrasonik destekli ekstraksiyon numunelere ısı işlem uygulanmadan, düşük sıcaklıklarda uygulama sağladığından sıcaklıkla bozulan bileşiklerin ekstrakte edilmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir. Ayrıca ultrasonik destekli ekstraksiyon etkili, güvenli, ekstraksiyonda hücrelerin parçalanmasında yararlanılan ve yüksek verimde ekstrakt üretimi için kullanılan bir gıda işleme yöntemidir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi, geleneksel ekstraksiyon yöntemine göre daha düşük maliyetli, ekstraksiyon sisteminin kolaylıkla hazırlandığı ve ekstraksiyon veriminin yüksek olduğu alternatif yöntemlerden biridir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri katı ile sıvı yüzey arasındaki teması artırmaktır. Ultrasonik destekli ekstraksiyon gerçekleşirken yardımcı bir kimyasal gerektirmemekte ve hedeflenen bileşiklerin yapısında herhangi bir değişiklik oluşmamaktadır. Ayrıca geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre daha az miktarda çözücü kullanılmaktadır (Wang ve Weller, 2006; González-Centeno ve ark., 2015). Ultrasonun ekstraksiyon çözücüsüne uygulanması ile çözücünde mekanik bir etki oluşarak çözücünün numuneye daha iyi nüfus etmesi ve hedef bileşiklerin katı numuneden yüksek verimle ekstrakte olması sağlanır (Vinatoru, 2001; Rostagno ve ark., 2003).

Ultrasonik destekli ekstraksiyon gerçekleşirken ultrasonik dalgaların homojen bir şekilde dağılabilmesi için uygun koşularda ekstraksiyon sistemi hazırlanmalıdır. Ekstraksiyonda katı miktarın fazla olması verimi dűřürmektedir. Oluřan ultrasonik dalgaların ekstraksiyon anında sabit kalmasını önlemek ve ekstraksiyon verimini artırmak için ekstraksiyon sistemi karıştırılmalıdır (Vinatoru ve ark., 1999).

Ultrasonik destekli ekstraksiyonultrasonik banyo ve özel üretilmiş prop kullanılarak iki tür sistemle gerçekleştirilmektedir (Rostagno ve ark., 2003). Ultrasonik banyo ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda örnek ile çözücünün konulduğu kap ultrasonikses dalgalarının enerjisinin bir kısmını tutuğu için ekstraksiyon verimi azalır. Özel üretilmiş proplu sistemlerde ultrasonik ses dalgaları örnek ile çözücü doğrudan etkileşim halinde olduğundan ekstraksiyon veriminde herhangi bir dűřű oluşmamaktadır (Chowdhury ve Viraraghavan, 2009). Ultrasonik destekli ekstraksiyonu kullanılarak bitkilerden elde edilen fenolik bileşikler ile ilgili çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların bir kısmına bakacak olursak;

Melguizo Melguizo ve arkadaşları (2014), *Artemisia vulgaris* yapraklarında farklı çözücü kullanarak maserasyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon uygulaması yapmışlardır. Toplam fenolik içeriği ve ekstraksiyon verimi açısından en iyi sonuçların metanol çözücüsünde 8 ardışık ultrasonik destekli ekstraksiyonundan (7920 μg GAE/g kuru bitki) oluştuğunu belirlemişlerdir. Daha sonra belirlenen bu ekstraktın antioksidan bileşiklerini karakterize etmek için elektrosprey iyonizasyon dört kutuplu uçuş süresi ktle spektrometresi ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanarak fenolik bileşiklerin yanı sıra, klorojenik asit türevleri veya flavonoidler olarak toplam 22 bileşik tanımlamış ve klorojenik asit türevlerinin en bol olduğunu tespit etmişlerdir. *Artemisia vulgaris* ekstraktının in vitro antioksidan kapasitelerini DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) yöntemiyle EC50 değerinin $16,0 \pm 0,6$ (μg extract/ml) ve ORAC (oxygenradical-absorban cecapacity) yöntemiyle 5700 ± 400 μmol trolox eşdeğerisi/g ekstrakt olarak tespit etmişlerdir.

Corbin ve arkadaşları (2015), keten tohumu fenolik bileşiklerinin ultrasonik destekli ekstraksiyonunu incelenmiştir. Bu yöntemde öğütölmüş keten tohumunda bulunan fenolik bileşenlerinin ultrasonik destekli ekstraksiyonu esnasında müsilaaj oluşumunda (şişme ve lapa haline gelme) önemli derecede azalma olduğunu belirlemişlerdir. Keten tohumundan fenolik bileşenlerin ultrasonik destekli ekstraksiyonunda en uygun koşullar alkali hidrolizi için 0,2 N sodyum hidroksit çözeltisi ilavesi ile 25 °C’de, 30 kHz frekansta, 60 dakikada gerçekleştirmişlerdir. Uygun koşullar altında ultrasonik destekli ekstraksiyonu diğer uygulanan ekstraksiyon yöntemlerine göre en yüksek fenolik bileşenlerin sağlandığını belirlemişlerdir.

Goltz ve arkadaşları (2018), Macela (*Ashyrocline satureioides*), Güney Amerika kökenli bir bitki olup, potansiyel antioksidan aktivitesine sahip olduğundan incelemişlerdir. Bu çalışmada, Macela’nın biyoaktif bileşiklerinin ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için çalışmışlardır. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin ön analizler ile karşılaştırma yapılarak % 50 (h/h) aseton ve % 70 (h/h) etanol olduğunu belirlemişlerdir. Ekstraksiyonlarda ultrasonik destekli ekstraksiyon uygulaması, geleneksel ekstraksiyona kıyasla toplam fenolik bileşiklerin miktarını 6,1 kat ve antioksidan aktiviteyi 3,4 kat arttığını tespit etmişlerdir. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda 25 °C’de maksimum toplam fenolik bileşiklerin içeriğinin yanı sıra en yüksek DPPH, ABTS ve FRAP antioksidan aktivitelerini gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu sıcaklık dikkate alındığında, 1:40 (w/v) çözünen: çözücü oranı, zamandan bağımsız olarak (10, 50 veya 90 dakika) en iyi ekstraksiyon koşulunu sunduğunu tespit etmişlerdir. UPLC analizlerinde Ultrasonik destekli ekstraksiyonun % 50 (h/h) aseton ve % 70 (h/h) etanol ekstraktlarında en yüksek miktarda bulunan biyoaktif bileşik quercetin olduğunu ve ardından kaempferol ve rutin olduğunu göstermişlerdir.

Bouaoudia Madi ve arkadaşları (2019), ultrasonik destekli ekstraksiyonu kullanarak fenolik bileşiklerin siyah mersin (*Myrtus communis* L.) meyve kabuğu ekstraksiyonunu optimize etmek için yanıt yüzey metodolojisi (Response surface methodology, RSM)

kullanmışlardır. Sonuçları, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve geleneksel çözücü ekstraksiyon metotları ile karşılaştırmışlardır. Ultrasonik destekli ekstraksiyonu ile elde edilen optimize edilmiş ekstrakttaki bileşenler ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi diyot dizisi dedektör ile birleştirilmiş elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi (UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ) ile tanımlanmıştır.

Toplam fenolik bileşiklerin verimi RSM modeli tarafından belirlenen optimal parametre koşullarına göre, etanol konsantrasyonunu % 70 (h/h), süresini 7,5 dakika, çözücü-katı oranını % 30 olarak tespit etmişlerdir. Toplam fenolik bileşiklerin deneysel verimi (241,66±12,77 mg gallik asit eşdeğeri/g kuru ağırlık), öngörülen değeri (235,52±9,9 mg gallik asit eşdeğeri/g kuru ağırlık) doğrularak model geçerliliğini de doğruladığını göstermişlerdir. Optimize edilmiş koşullar altında Ultrasonik destekli ekstraksiyonu mikrodalga destekli ekstraksiyon ve geleneksel çözücü ekstraksiyon metotlarına göre daha çok mirisetin glikozitleri içeren antioksidanların çıkarılmasında daha etkili olduğunu bulmuşlardır.

2.5.4. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction, ASE)

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu yeni ekstraksiyon tekniklerinden biri olarak günümüzde kullanılmaktadır. Basınçlı çözücü ekstraksiyonu olarak da adlandırılmaktadır. Genelde katı örneklerdeki hedef bileşenleri ekstrakte etmek için kullanılan bir tekniktir. Örneğe yüksek basınç uygulayarak geleneksel çözücülerin ekstraksiyon esnasında daha yüksek sıcaklıklara çıkmasına olanak sağlayan kapalı bir sistemdir. Ortamın basıncının yükseltilmesi çözücünün kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklarda bile sıvı halde olmasına olanak sağlar. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda uygulanan sıcaklık ekstraksiyon verimini ve seçiciliğini etkileyen önemli bir etkidir. Ekstraksiyon anında örneğe uygulanan yüksek sıcaklık örnekte bulunan moleküllerin arasında bulunan Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol çekimi gibi moleküller arası etkileşimlerin bozulmasına neden olduğundan ekstraksiyon verimini yükseltmektedir (Richter ve ark., 1996).

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon tekniğinde 2-20 dakikada 3-20 MPa basınç ve 40-200 °C sıcaklık koşullarına dayanıklı kapalı bir sistem ile örneklerin ekstraksiyonu kolay bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Ju ve Howard, 2003). Isının örnek- hedef bileşen matriksine uygulanmasıyla benzer yapıdaki moleküller arasında bulunan kohezyon kuvvetlerinin ve farklı yapıdaki moleküller arasında bulunan adhezyon kuvvetlerinin ortadan kalkmasına neden olur. Bu kuvvetlerin ortadan kalkmasıyla geri bırakma (desorpsiyon) gerçekleşirken gerekli aktivasyon enerjisi azalır. Örnek–hedef bileşen matriksinin ekstraksiyonunda çözücüye uygulanan yüksek sıcaklık matriksin ve çözünenin yüzey gerilimini azaltarak örneğin kolaylıkla ıslanmasına neden olur. Çözeltinin yüzey gerilimindeki azalma, çözücü kavitesinin daha kolay oluşmasına ve bundan dolayı hedef bileşenlerin çözücüye daha hızlı geçmesine olanak sağlamaktadır (Möckel,ve ark., 1987).

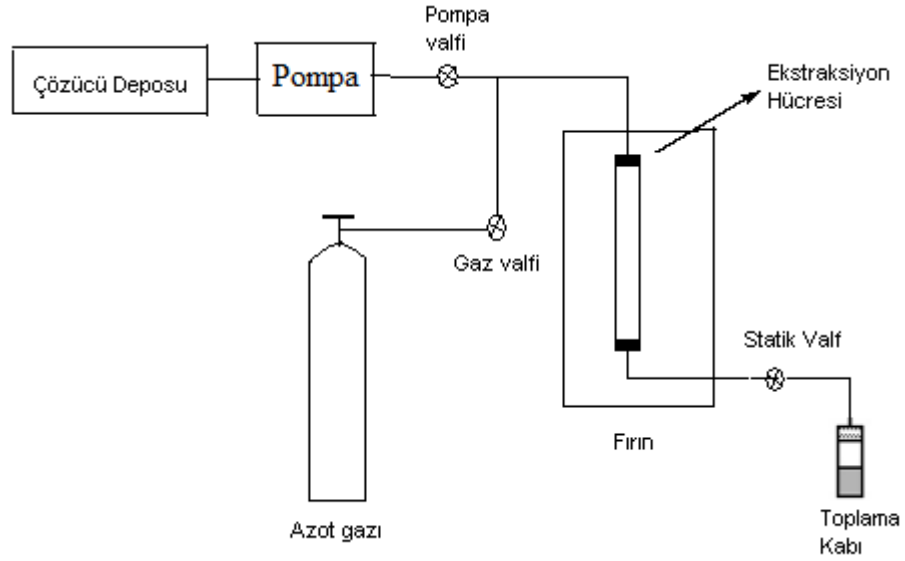
Bu özelliğinden dolayı hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre zaman tasarrufu, çözücü tüketimi, ekstraksiyon verimi ve tekrarlanabilirlik açısından üstünlükler sunmaktadır (Kaufmann ve Christen, 2002). Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda örnek miktarı, örnek yapısı (organik bileşim, su içeriği, tanecik boyutu ve heterojenlik), örnek ön hazırlama işlemleri (kurutma, öğütme gibi), çözücü türü, çözücü miktarı, çözücü akış hızı, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon döngü sayısı ekstraksiyon verimine etki eden önemli faktörlerdir. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda incelenen örneğin yapısına göre ekstraksiyon parametreleri belirlenerek önem kazanmakta ve bunun yanında en önemli parametreler çözücü türü ile ekstraksiyon sıcaklığı ön plana çıkmaktadır (Bjorklund ve ark., 1999; Carabias Martinez ve ark., 2005). Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon tekniğinde yüksek sıcaklık ve yüksek basınç her zaman yüksek verimle sonuçlanmaz. Örnekteki hedef bileşenlerin bozulmasına neden olabilir (Bjorklund ve ark., 1999).

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda kullanılan çözücünün kritik sıcaklığını ve kritik basıncını geçmeyecek durumda yüksek sıcaklık ve yüksek basınç uygulayarak ekstraksiyon yapıldığından dolayı basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu, subkritik çözücü

ekstraksiyonu, süper ısıtılmış çözücü ekstraksiyonu ve basınçlı çözücü ekstraksiyonu gibi farklı isimlerle de anılmaktadır (Luque de Castro ve Priego Capote, 2012).

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda suya yüksek basınç ve yüksek sıcaklık uygulanması çözme özelliğini ve ekstraksiyon etkinliğini arttırmaktadır. Bu teknikte genellikle çözücü olarak suyun tercih edilmesi ucuz olması, doğaya zarar vermemesi ve toksik olmaması gibi avantajlar sunmaktadır (Benthin ve ark., 1999). Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon tekniğinde çözücü olarak su kullanıldığında ekstraksiyon teknikleri subkritik su ekstraksiyonu, sıcak su ekstraksiyonu, basınçlı sıcak su ekstraksiyonu, yüksek sıcaklıkta su ekstraksiyonu, süper ısıtılmış su ekstraksiyonu gibi isimler almaktadır (Ju ve Howard, 2003).

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon tekniğinde su veya organik çözücü kullanarak statik ve dinamik koşullarda gerçekleştirilmesinin yanı sıra her ikisinin bir kombinasyonu halinde de ekstraksiyon gerçekleştirilebilir. Statik koşullarda kapalı bir kapta yüksek bir basınç ve / veya yüksek sıcaklıkta ekstraksiyon gerçekleştirilebilir. Dinamik koşullarda çözücü örneğin içinden geçirilerek gerçekleştirilir. Genelde ekstraksiyon gelişmiş sistemli cihaz ile gerçekleştirilir. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon sistemi çözücü deposu, yüksek basınçlı pompa ve basınç altında tutan sistem, ekstraksiyon hücresi, fırın, çeşitli vanalar, azot gazı ve ekstrakt toplama kabından oluşur (Şekil 2.16) (Camel, 2001; Luque de Castro ve Priego Capote, 2012).



Şekil 2.16: Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon sisteminin cihaz şeması (Richter ve ark., 1996).

Son zamanlarda Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu ile bitkisel kaynaklardan fenolik maddelerin ekstraksiyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Barros ve arkadaşları 2013, sorgum kepeğinden yüksek basınç ve sıcaklık koşulları altında farklı çözücüler kullanarak fenolik bileşiklerin ekstrakte edilebilirliğini değerlendirmişlerdir. Siyah ve tanen sorgum kepeğindeki polifenoller 60, 120 ve 150 °C'de hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunu (ASE) kullanarak ekstrakte etmişlerdir.

Siyah sorgumun % 50 ve % 70 etanol/su (h/h) çözücüleri kullanarak 120 ve 150 °C'de hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonundan elde edilen sonuçlar, % 70 aseton/su (h/h) ve % 1 HCl içeren metanol çözücüsü kullanarak geleneksel ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlardan % 12 daha fazla antioksidan (628 mmol TE/g) tespit etmişlerdir. Bununla birlikte benzer miktarda fenolik içeriklerin (45 mg GAE/g) ekstrakte edilmesinde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Yüksek basınç ve sıcaklık, tanen sorgumdaki fenollerin ve antioksidanların ekstraksiyonu, siyah sorgumdaki ekstraksiyonunu kadar etkili olmadığını gözlemlemişlerdir. Bu durum, iki örnek arasındaki tane yapısından ve fenolik profildeki farklılıklar nedeniyle olabileceğini belirtmişlerdir.

Kanmaz 2014, yaptığı çalışmada, keten tohumu (flaxseed (*Linum usitatissimum* L.)) unu çubukları içindeki fenolik bileşikleri, hızlandırılmış çözücü ekstraktörü kullanarak subkritik su ekstraksiyonu ile ekstre etmiştir. Bu amaçla keten tohumu unu çubuklarından SDG (secoisolariciresinol diglucoside) lignan, toplam fenolik ve toplam flavonoidlerin subkritik su ekstraksiyonu ile sıcaklık (160, 170 ve 180 °C) ve ekstraksiyon süresi (5, 15, 30 ve 60 dakika) arasındaki etkileşimleri incelemiştir. Subkritik su ekstrelerinde SDG lignanın en yüksek ekstraksiyon verimi (% 77,01) 60 dakika boyunca 160 °C'de olduğunu belirlemiştir. Bununla birlikte, 15 dakika ekstraksiyon süresi için 170 °C'de % 70,67 ve 180 °C'de % 72,57 ekstraksiyon verimleri takip etmiştir. Yüksek miktarlarda SDG lignanını 15 dakika boyunca 170 °C'de 12,60 mg/g kuru ağırlık ve 180 °C'de 12,94 mg/g kuru ağırlık olarak elde etmiştir. Toplam fenolik madde için en yüksek ekstraksiyon verimi 180 °C'de 15 dakika boyunca % 70,82 ve 30 dakika boyunca % 71,05 olarak belirlemiştir ve bu verimler arasında önemli ölçüde bir fark olmadığını belirlemiştir. Toplam fenoliklerin en yüksek miktarı 180 °C'de 30 dakika boyunca subkritik su ekstraktlarında $1081,88 \pm 5,15$ mg ferrulik asit/100 g kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir. Toplam flavonoidlerin en yüksek ekstraksiyon verimi 180 °C'de 15 dakika boyunca olduğu belirlenmiştir. Toplam flavonoidlerin en yüksek miktarı, 30 dakika boyunca 180 °C'de $96,79 \pm 5,83$ mg luteolin/100 g olarak belirlemiştir.

Toubane ve arkadaşları 2017, Cezayirde yetişen *Carthamus Caeruleus* L. bitkisinin köklerinin hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) kullanarak doğal bileşiklerin ekstraksiyon optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Optimizasyon çalışması üç farklı çözücü kullanılarak (etanol, metanol ve heksan) ve 40-50 °C sıcaklık aralığında, statik ekstraksiyon süresi 30-50 dakika aralığında ve döngü sayısı 1-5 aralığında olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her çözücü için maksimum ekstraksiyon verimi optimum ASE koşulları tahmin edilerek, bitki gözeneklerinin şekilleri çözücülerden etkileştirmeden önce ve çözücülerden etkileştirdikten sonra ekstraksiyon elektron mikroskobu (SEM) ile taranarak belirlemişlerdir. Ekstraktların fitokimyasal analizi, gaz kromatografisine bağlı kütle spektroskopisi (GC-MS) ile değerlendirmişlerdir. Ekstraktların toplam fenolik bileşenlerini ve toplam antioksidan aktivite tayinini 2,2-

difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal temizleme yöntemi ile tespit etmişlerdir. En yüksek toplam fenolik bileşen miktarı etanol ekstraktlarında 190,98 mg galik asit eşdeğeri/g kuru ağırlık olarak ve en yüksek antioksidan etki, çözücü olarak etanol kullanıldığında EC50 değeri 1,51 mg/ml olarak belirlemişlerdir.

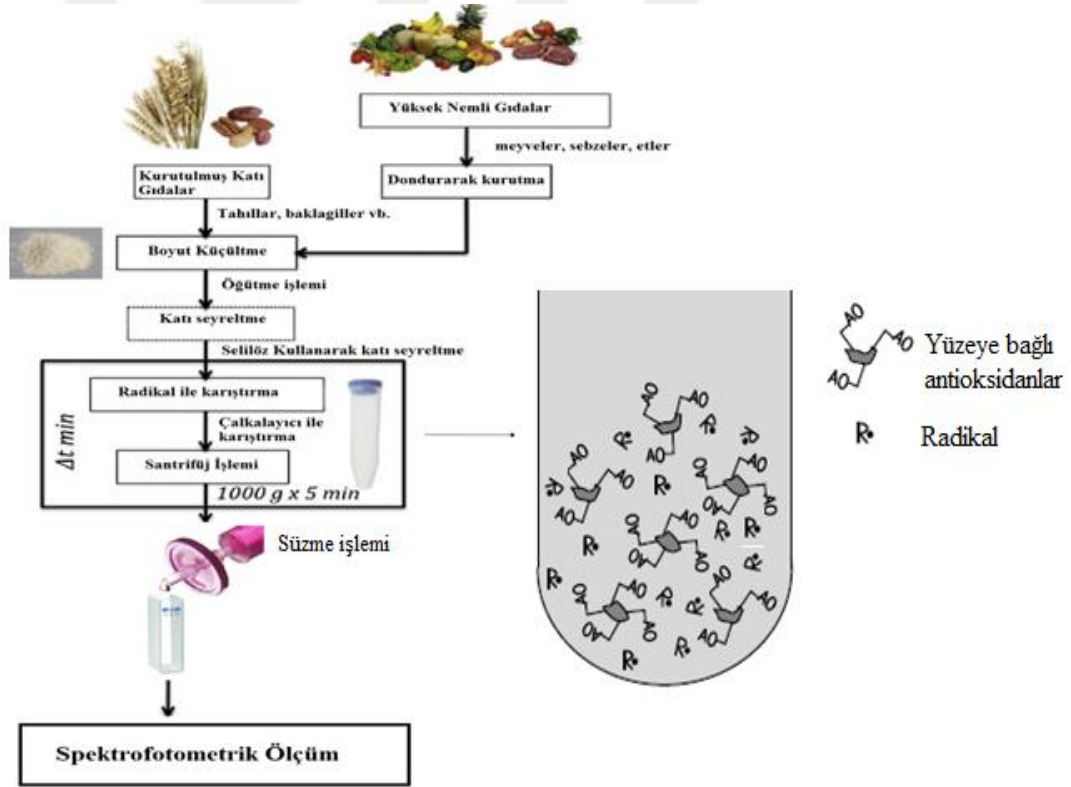
2.6. QUENCHER Metodu

Klasik ölçüm metotları ile toplam antioksidan aktivite belirlenirken büyük ölçüde su, organik çözücü ve belirli oranlarda su-organik çözücü karışımı ile elde edilen ekstraktlar kullanılır. Fakat, ekstraksiyonu yapılacak örneğin içerisinde var olan bütün antioksidanları, kompleks halde bulunan karbonhidratları ve ilgili olan tüm bileşenleri ekstrakte edebilecek etkinlikte bir çözücü bulunmamaktadır (Bravo ve ark., 1994). Genel olarak ABTS (Miller ve ark., 1993; Re ve ark., 1999), DPPH (Brand-Williams ve ark., 1995), ORAC (Cao ve ark., 1993), FRAP (Benzie ve Strain, 1996), CUPRAC (Apak ve ark., 2004) gibi antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinde sıvı çözücüde çözünebilir antioksidan bileşenler ile sıvı çözeltide hazırlanmış radikallerin tepkimesinden aktivite belirlenebilmektedir.

Bitkiler ve özellikle tahıl türü lifli bitkilerden antioksidan aktivite belirleme çalışmalarında kullanılan birçok çözücü ve çözücü karışımlarının yetersiz olmasından dolayı bazı serbest ve bağlı antioksidan grupların ekstraksiyonu tam olarak yapılamadığından antioksidan aktivite tam olarak belirlenmemektedir (Pérez-Jiménez ve Saura-Calixto, 2005). Bitkisel kaynaklarda serbest halde ve bağlı yapıda bulunan antioksidan özellik gösteren maddelerin ekstrakte edilebilmesi için bazı kimyasallar veya enzimler kullanılmakta bu durum doğal yapıya zarar verdiğinden dolayı kullanılan metodun uygun bir şekilde çalışmasını engellemektedir (Pérez Jiménez ve Saura Calixto, 2005). Bitkilerden ekstrakte edilemeyen bağlı durumda kalan önemli miktardaki antioksidan yapılar, yapılan antioksidan analizleri sonucunda belirlenmemektedir. Fakat, bağlı durumda kalan antioksidan bileşenler vücuda

alındığında sindirim enzimleri ve bağırsak florasının etkisiyle bağlı olduğu yerden koparak yüksek derecede biyolojik etkiler göstermektedir (Pérez Jiménez ve ark., 2008).

Katı örneklerin yüzeyinde bağlı formda bulunan çözünmeyen antioksidan aktivite gösteren bileşenlerin antioksidan aktivitelerinin daha kolay bir şekilde belirlenmesi amacıyla yeni bir prosedür geliştirilmiştir (Serpen ve ark., 2007). Katı gıdalarda bulunan çözünmeyen fonksiyonel grupların antioksidan aktivite göstermeleri olası bir durumdur. Bu fonksiyonel grupların çözücü içerisinde serbest radikalleri süpürmesi farklı iki yüzey arasında (katı-sıvı) gerçekleşen tepkime ile açıklanabilir bu durum Şekil 2.17' de görülmektedir (Serpen ve ark., 2007).



Şekil 2.17: Doğrudan QUENCHER prosedürünün temel adımları ve radikal molekülleri ile katı partikülün yüzeyine bağlı antioksidan bileşenler arasındaki yüzey etkileşiminin şematik gösterimi (Gökmen ve ark., 2009; Serpen ve ark., 2007).

Katı örneklerde çözünmeyerek bağlı yapıda kalan antioksidan özellik gösteren bileşenlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenebilmesi, katı gıdalarda hem çözünebilen hem de çözünemeyen antioksidanların toplam antioksidan aktivitelerinin doğrudan ölçülebileceği düşüncesini gündeme getirmiştir (Serpen ve ark., 2008a).

Bitkilerin yapısında serbest halde bulunan antioksidan bileşiklerin uygun koşullarda ekstraksiyonu sağlandıktan sonra bağlı yapıda bulunan antioksidan bileşikler için de hidroliz işlemi yapılması gerekmektedir. Bu durum işlem sayısını artırdığından dolayı analiz süresi ve zorluk derecesi artırmakta ve ayrıca ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu gibi faktörlerden dolayı analiz için önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bu olumsuzluklardan dolayı Gökmen ve arkadaşları (2009), tarafından geliştirilen katı örneklerin antioksidan kapasitesini belirlerken ekstraksiyon ve hidroliz işlemleri yapmadan literatürde var olan antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin doğrudan uygulanmasını öngören işlem olan (hızlı (QUick), kolay (Easy), yeni (New), ucuz (CHEap) ve tekrarlanabilir (Reproducible) “QUENCHER” metodu ön plana çıkmaktadır (Gökmen ve ark. 2009).

QUENCHER metodu ekstraksiyon işlemi yapılmadan katı örnek ile radikal çözeltisinin doğrudan etkileştirilmesiyle gerçekleştirilir. Katı örnekte çözünür yapıda bulunan serbest haldeki antioksidan bileşenlerin aktivitesi çözeltide bulunan radikaller ile sıvı-sıvı etkileşim gerçekleşirken, çözünmeyen bağlı yapıdaki antioksidan bileşenlerin katı-sıvı ara yüzeyinde gerçekleşen yüzey reaksiyonuna bağlı olarak antioksidan aktivite göstermektedir (Serpen ve ark., 2007). QUENCHER yöntemi tahıl ürünlerine, kuruyemiş ürünlerine, meyve ve sebze gibi birçok örneğe başarıyla uygulanmıştır (Serpen ve ark., 2008a; Serpen ve ark., 2008b; Açar ve ark., 2009; Serpen ve Gökmen, 2009).

QUENCHER metodunun, lifli ve tahıllı bitkilere uygulanan geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre daha yüksek sonuçlar verdiği veya bazı durumlarda da yaklaşık antioksidan aktivite sergilediği belirlenmiştir. Bu yöntemin daha güvenilir ve daha

hassas bir antioksidan aktivite değeri vermesinin yanında uzun zaman alan ekstraksiyon işlemlerinin olmayışı, geleneksel yöntemlere göre çok daha hızlı olması en önemli avantajlarıdır. Lifli gıdaların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan oldukça başarılı ve kullanışlı bir yöntemdir. Ayrıca, yüksek sıcaklıkta katı gıdalara yapılan işlemler için de geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında çok daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Gökmen ve ark., 2009).

QUENCHER metodu ile ekstraksiyon işlemi yapmadan çözünen ve çözünmeyen bileşenleri doğrudan antioksidan kapasite ölçümünden daha gerçekçi sonuçlar elde edilmektedir. Lifli gıdalarda bulunan çözünmeyen yapıdaki bağlı önemli miktardaki antioksidan bileşenlerin belirlenmesi lifli yapıda olan gıdaların yapısal önemine yeni bir bakış açısı getirmiştir (Vitaglione ve ark., 2008).

Serpen ve ark. (2008a), tahılların antioksidan kapasitesinin doğrudan ölçümü için basit ve hızlı bir prosedür geliştirilmişlerdir. Analizi yapılacak örneğin öğütülmesi, (ABTS) radikaliyle karıştırılması, santrifüjlenmesi ve absorbansın ölçülmesi gibi işlem basamakları gerçekleştirilmelidir. Bu doğrultuda iki farklı işlem uygulamışlardır. Birinci uygulama toplam antioksidan kapasitenin etanol: su (1:1 v/v) çözeltisinde hazırlanan ABTS radikali kullanılarak örnek ile doğrudan etkileşimi ile belirlenmesi ve ikinci uygulama örneğin katı-sıvı ekstraksiyon ve sonrasında kimyasal/enzimatik hidroliz işlemlerinin uygulanmasından sonra ABTS radikalinin uygulandığı işlemidir. Doğrudan uygulanan işlem ile tahıllarda bağlı halde bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerini karşılaştırmada geleneksel yöntem ve alkali hidrolizi işlemlerine göre daha yüksek toplam antioksidan kapasite elde etmişlerdir. En yüksek toplam antioksidan kapasitesinin doğrudan etkileşim prosedürüyle esmer buğdayda ($93,6 \pm 1,6$ mmol TE/kg) olduğunu belirlemişlerdir.

Gökmen ve arkadaşları (2009), tarafından gıdaların ekstraksiyon işleminden sonra bağlı antioksidanların belirlenmesi için kimyasal hidroliz işlemine ihtiyaç duyulması ve

birçok işlemin gerçekleşmesi sonucu antioksidan kapasitenin tam anlamıyla belirlenememesinden dolayı QUENCHER yaklaşımı geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada katı gıdalarda toplam antioksidan kapasitenin doğrudan ölçümü için katı numuneler ve serbest radikaller ile doğrudan toplam antioksidan kapasite analizi gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada buğday, yulaf, çavdar, pirinç, arpa, esmer buğday ve mısır tahıllarının toplam antioksidan kapasiteleri QUENCHER yöntemi uygulanmış ve ayrıca bu örneklerle geleneksel ekstraksiyon işlemi gerçekleştirdikten sonra hidroliz işlemi uygulanarak ekstraksiyon işlemi uygulamışlardır. QUENCHER yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasitenin yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte ekstraksiyon yöntemleri kıyaslandığında etanol/su (h/h) karışımı ile yapılan ekstraksiyon sonucu belirlenen antioksidan kapasite değerleri metanol ile yapılan ekstraksiyon sonucu antioksidan kapasite değerlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Serpen ve ark. (2012b), yaptıkları bir çalışmada buğday, pirinç, çavdar, bakliyat, meyve, sebze ve fındık örnekleri ABTS ve DPPH radikallerinin 0:100; 25:75; 50:50; 75:25; 100:0 oranlarında hazırlanan su:etanol karışımlarında doğrudan QUENCHER prosedürünü kullanarak antioksidan kapasitelerini incelemişlerdir. Antioksidan kapasite su:etanol karışımında etanol:su oranının 50:50 olduğunda önemli derecede arttığı, saf etanol kullanıldığında en düşük değer olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlar, su-etanol karışımının (50:50, v/v) QUENCHER prosedürü ile test edilen gıdaların toplam antioksidan kapasite veritabanını standartlaştırmak için en uygun çözücü olabileceğini göstermişlerdir. Su ihtiyacının, radikallerin gıda matrikslerinin fonksiyonel uçlarına daha iyi erişmesini sağlayan yapıyı açma kabiliyetinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Ayrıca FRAP yönteminde bu örneklerle uygulamışlardır. FRAP testinde kullanılan çözücü su olduğundan, klasik prosedürü doğrudan QUENCHER prosedürüne uyarlamak için çözücü değiştirme işlemi uygulamamışlardır. QUENCHER- FRAP prosedürü ile yapılan çalışmada çileğin $224,3 \pm 5,9$ mmol Troloks/kg kuru ağırlık değerinde en yüksek ferrik indirgeyici antioksidan gücüne sahip olduğunu belirlemiş ve sırasıyla badem, mercimek, ıspanak, elma, Antep fıstığı, fındık, fasulye, çavdar, pirinç

takip etmiş buğdayın ise en düşük değer olarak 5,0 – 0,7 mmol Troloks/kg kuru ağırlık değerini belirlemişlerdir.

Tufan ve ark. (2013), bu gelişmelerle beraber tahıl örneklerinin toplam antioksidan kapasitelerinin doğrudan belirlenebilmesi için “QUENCHER” prosedürünü CUPRAC yöntemine tepkime süresi ve çözücü seçimi gibi parametreleri optimize ederek uyarlamış ve çözücü etanol:su (1:1, v/v) kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemiyle daha yüksek toplam antioksidan kapasite değerlerinin elde edildiğini belirlemişlerdir. QUENCHER-CUPRAC yöntemi olarak adlandırılan bu yöntem çeşitli gıda örneklerine başarıyla uygulamışlardır. Çalışmada buğday, yulaf, çavdar, pirinç, arpa, esmer buğday ve mısır gibi tahıl örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri geleneksel ekstraksiyon ve hidroliz işlemleriyle toplam antioksidan kapasite değerlerini belirlemişlerdir. Ayrıca QUENCHER-CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri literatürde bulunan QUENCHER-ABTS, QUENCHER-DPPH prosedürlerinden elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri mmol troloks eşdeğeri (TE)/kg⁻¹cinsinden hesaplanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Tahıl örneklerinin QUENCHER-CUPRAC yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (mmol TE/kg) sırasıyla; buğday ruşeymi (40,22 ± 1,86) > arpa (26,35 ± 0,61) > çavdar (16,21 ± 0,25) > sorgum (13,55 ± 0,55) > buğday (13,44 ± 0,46) > yulaf (10,46 ± 0,23) olarak bulunmuştur. QUENCHER-CUPRAC yöntemi ile diğer QUENCHER-ABTS, QUENCHER-DPPH prosedürlerine ve geleneksel ekstraksiyon ve hidroliz işlemlerine göre daha yüksek toplam antioksidan kapasite değerleri elde etmişlerdir.

Çelik ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada gıdalarda çözünmeyen bağlı antioksidan özellik gösteren bileşenlerin rejenerasyon potansiyelini incelemişlerdir. Çalışma, besinsel lif ve antioksidanlarca zengin çeşitli gıdalar kullanılarak in vitro koşullarda gerçekleştirmişlerdir. Gıdalarda çözünen yapıların uygun ekstraksiyon ile uzaklaştırılmasından sonra, çözünmeyerek bağlı olarak kalan yapıların antioksidan kapasiteleri QUENCHER prosedürüyle ABTS^{•+} ve DPPH[•] radikallerinin çözeltilerini kullanarak belirlemişlerdir. Ölçümden sonra, çözünmeyen kalıntıdaki fazla radikalleri

uzaklaştırmak için yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve lif üzerindeki sönümlenmiş antioksidan yapıları tekrar rejenerasyon için saf antioksidan çözeltisi veya antioksidan bakımından zengin bir içecek ile etkileştirilerek antioksidan kapasitesi tekrar belirlenmiştir. İkinci ve üçüncü rejenerasyon basamakları da ayrıca gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda lifli gıdalarda bağlı antioksidanların sıvı çözeltide bulunan antioksidan bileşikler ile üç defa yüksek derecede rejenere olabileceğini göstermişlerdir. Rejenerasyon verimliliğinin, çözünmeyen gıda matrisi ve rejenerasyon ajanının özelliğine bağlı olarak % 21,5 ile % 154,3 arasında değiştiği belirlenmiştir. İncelenen gıda örnekleri arasında, tahıl ürünlerinin biraz daha yüksek rejenerasyon verimliliğine sahip olduğu, buna karşın antioksidan bakımından zengin içeceklerin rejenerasyon ajanları olarak saf antioksidanlardan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Buğday kepeği referans çözünmeyen malzeme olarak alındığında, içeceklerin yenilenme yetenekleri aşağıdaki sırayla yeşil çay>espresso kahve> siyah çay> hazır kahve> portakal suyu> kırmızı şarap olarak belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular ışığında gıdalarda çözünmeyerek bağlı halde bulunan antioksidanların fizyolojik önemine dikkat çekmişlerdir. Bu sonuçlar, gastrointestinal kanaldaki çözünmeyen gıda maddesine bağlı antioksidanların olası fizyolojik ilişkisine dikkat çekmiştir. Sindirim sürecinde gastrointestinal kanalda bulunan bu antioksidanlar serbest radikallere karşı etki gösterebileceğini ve aynı zamanda alınan öğünlerde bulunan diğer antioksidan bileşikler tarafından rejenere edilebileceğini ortaya koymuşlardır.

Henrion ve ark. (2018), QUENCHER yönteminin, endüstriyel açıdan oldukça alakalı görünen in vitro antioksidan kapasiteyi ölçen, zamandan ve maliyetten tasarruf sağlayan bir ekstraksiyon içermeyen prosedür olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte çalışmada, örneğin öğütülmesi ve kütlenin ölçümü gibi kritik noktaları ele almışlardır. ABTS hacminin sabit tutulup örnek kütlesinin artırılmasıyla troloks eşdeğeri

antioksidan (TEAC) kapasite değerlerinin % 50'ye kadarlık bir oranda azaldığını belirlenmişlerdir. Tavsiye edilenden daha yüksek ABTS radikal konsantrasyonunda çalışıldığında, TEAC değerlerini % 30 arttırdığı tespit etmişlerdir. Kepek bakımından zengin örneklerin yapılan öğütme çeşitlerinden sadece kriyo öğütmenin tanecik boyutlarının önerilen aralığa uygun olduğunu belirlemişlerdir. Örneklerde boyut küçültmenin yapılması TEAC değerlerini % 90'a kadar arttırdığını tespit etmişlerdir. Ultrafine jet-öğütmenin etkisi, kriyo-öğütmeye göre sistematik olarak TEAC değerlerini etkilememiştir. Önerilen model yaklaşımı, QUENCHER yaklaşımının en iyi avantajlarından faydalanmayı sağlamışlardır ve bu yöntemin endüstriyel uygulamalar için ideal olduğunu göstermişlerdir.

2.7. Bitkilerde Oluşan Bileşenlerin Analizinde Kullanılan nemli Analitik Teknikler

Bitkilerde oluşan bileşenlerin incelenmesi ile elde edilen bilgiler, birçok hastalığın tedavisinde bu bileşenlerin nasıl kullanılabileceğine yönelik araştırmaların önemli bir bölümünü oluştırmaktadır. Çok büyük bir doğal bileşik kaynağı olan doğal bitkilerden ilaç etken maddesi olarak kullanılabilme potansiyeline sahip birçok molekül elde edilebilir (Huang ve ark. 2004; McChesney ve ark. 2007). Bu türden çalışmalarda klinik çalışmaların güvenilir ve tekrarlanabilir olması, çalışılan bileşenin farmakolojik olarak yararlı yada zararlı olduğuna karar verililebilmesi ve daha kaliteli sonuçlar elde edilebilmesi için bitkilerde bulunan tüm biyoaktif bileşenlerin analiz edilerek belirlenmesi önem arzetmektedir. Bitkilerden çeşitli ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstraktların karmaşık yapıya ve farlı içeriklere sahip olması bitkilerin kimyasal bileşimlerinin tespitinde kullanılan ayırma ve belirleme yöntemi için birçok zorluk oluştırmaktadır (Marston ve Hostettmann 2009).

Kromatografik ayırmalar, genellikle kompleks haldeki karışımlarda bulunan ve birbirinden ayrılmaları zor olan benzer yapıdaki moleküllerin ayrılmasına olanak sağlayan çeşitli yöntemler grubudur. Kromatografide ayırım gerçekleştirilirken numune

gaz, sıvı veya süperkritik akışkan hareketli fazların birinde çözülür ve uygun sabit bir fazla etkileştirmek üzere hareket ettirilir. Hareketli faz ve sabit faz seçimi numunede bulunan farklı türdeki bileşenlerin, bu fazlar arasında kendiliğinden ayrılacakları şekilde belirlenir. Sabit faz ile ayrımı yapılan numunenin içinde bulunan bileşenler güçlü bir etkileşim oluşturduğunda hareketli fazın akışı ile bu bileşenler yavaş bir şekilde birbirinden ayrılırlar. Fakat sabit faz ile bu bileşenler arasındaki etkileşim zayıf olur ise hareketli fazda tutunan bileşikler hızlı hareket ederler. Fazlar arasında ayrımı yapılan bileşenler, hızlarındaki farklılıklarınsonucunda kalitatif ve kantitatif olarak analizi gerçekleştirilebilen bantlara ayrılırlar (Skoog ve ark., 1998).

Kromatografide kullanılan hareketli faz, türüne göre üç ana kısımda değerlendirilebilir.

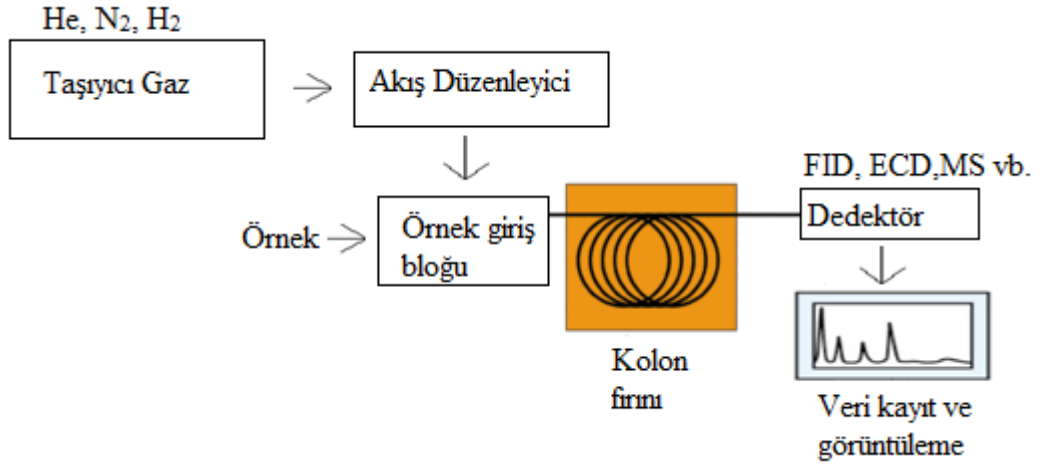
1. Gaz kromatografisi.(GC): hareketli fazın gaz olduğu kromatografisi.
2. Sıvı kromatografisi (LC): hareketli fazın sıvı olduğu kromatografisi.
3. Süperkritik akışkan kromatografisi (SFC): hareketli fazın kritik sıcaklığın üstünde bir sıcaklıkta basınç uygulanarak sıvı hale gelen gazlar ile gerçekleştirilen kromatografisi (Skoog ve ark., 1998; Gündüz, 2001).

Kromatografik ayırma yöntemleri farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Kromatografik yöntemler esas olarak sabit faz düzlemsel bir yüzeye tutturulmuş ise “düzlemsel”, kolon içinde tutturulmuş ise “kolon” olarak iki başlık altında incelenir. Ayrıca mekanizmalarına göre de, adsorpsiyon kromatografisi, dağılma (paylaşım) kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi, boyut eleme (jel filtrasyon) kromatografisi gibi farklı sınıflara da ayrılabilir (Skoog ve ark., 1998; Gündüz, 2001).

2.7.1. Gaz Kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisi (GC) bitkilerdeki uçucu ve ısıya dayanıklı organik bileşiklerin ayrılmasında ve analizinde yaygın olarak kullanılan bir analitik ayırma yöntemidir. Analiz edilmek istenen gaz halindeki analitlerin, katı desteğe tutturulmuş sabit faz ile hareketli faz arasında, uçuculuk farklarından dolayı farklı hızlarda ilerlemesiyle ayırma işlemi gerçekleşir. Katı destek üzerine kaplanmış sabit faz hareketsiz faz olarak tanımlanırken, ayrımı yapılan madde ile etkileşime girmeyen hareketli faz ise taşıyıcı gaz olarak tanımlanır. Analit, üzeri sabit fazla kaplanmış katı destek faz ile doldurulmuş farklı uzunluklarda bir cam veya metal kolondan geçirilerek farklı alıkonma sürelerinde ulaştığı, analize uygun birdedektör sistemi kullanılarak tespit edilir (Ersen ve ark., 2001; Esen, 2005).

Tüm kromatografi türlerinde olduğu gibi gaz kromatografisinde de ayrımı yapılacak hedef bileşenler ile hareketli faz arasında herhangi bir etkileşim meydana gelmemektedir. Gaz kromatografisinde genellikle hareketli faz olarak He, Ar ve N₂ gibi tepkimeye girme isteği olmayan asal gazlar kullanılır ve kolon içerisinde bulunan bileşenleri ileriye doğru taşır. Kolonun içerisinde gaz halinde bulunan bileşenler uçuculuklarından dolayı farklı hızlarda ilerleyerek farklı zamanlarda dedektöre ulaşırlar. Bitkilerde uçucu (esansiyel) yağların bileşimi genellikle gaz kromatografisi yöntemi ile belirlenmektedir. Bununla birlikte yağ asitleri gibi uçucu olmayan birçok molekülde türevlendirme işlemi gerçekleştirilerek uçucu hale getirilip analizleri gerçekleştirilmektedir (Yılmaz, 2015). Şekil 2.18’de gaz kromatografi cihazının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.18: Gaz kromatografi cihazının şematik gösterimi.

Modern bir gaz kromatografisinde gaz halinde bir mobil faz kaynağı, bir enjeksiyon bloğu, sabit fazı bulunduran bir ayırma kolonu, bir dedektör ve veri kayıt sisteminden oluşmaktadır. Gaz kromatografisinde, uçucu numuneyi gaz haline getirecek olan ve sürekli ısıtılan bir bloğa enjeksiyon gerçekleştirilir. Gaz halinde bulunan bileşenler sabit fazı bulunduran uzun kapiler bir kolon içerisinde He, Ar ve N₂ gibi bir hareketli faz tarafından sürüklenir ve ayrılan analitler dedektöre ulaşır ve veri kayıt sistemine kayıt edilir.

Gaz kromatografisinde, analiz edilecek örnekler katı, sıvı ve gaz halinde olabilir. Katı örnekler özel olarak hazırlanmış sıcak bir headspace ünitesinde gaz haline gelebilen bileşenlerin analizi gerçekleştirilirken, sıvı örneklerde ise enjeksiyon bloğunda bulunan sıcak bir hücrede gaz haline getirilerek analizler gerçekleştirilir. Gaz haline gelen örnekteki bileşenler kolonda bulunan sabit faz ile arasında oluşan farklı etkileşimlere göre taşıyıcı gaz ile birlikte farklı hızlarda ilerlediklerinden dolayı farklı zamanlarda dedektöre ulaşırlar. Gaz halindeki bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında gerçekleşen etkileşimde çözünürlük, bağlanma, adsorplama, moleküler boyut gibi parametreler önemli olmaktadır (Tutanç, 2009). Gaz kromatografisi (GC) cihazı 4 ana kısımdan oluşur; enjeksiyon, kolon, kolon fırını ve dedektör kısımlarıdır.

Gaz kromatografisinde, analiz edilecek örnekler katı, sıvı ve gaz halinde olabilir. Katı örnekler özel olarak hazırlanmış sıcak bir headspace ünitesinde gaz haline gelebilen bileşenlerin analizi açısından işleme tabi tutulurken, sıvı örnekler enjeksiyon bloğunda bulunan sıcak bir hücrede gazlaştırılarak analizler gerçekleştirilir. Gaz halindeki bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında gerçekleşen etkileşimlerinde çözünürlük, bağlanma, adsorplama, moleküler boyut gibi parametreler etkili olmaktadır (Tutanç, 2009). Gaz kromatografisi cihazı 4 ana kısımdan oluşur. Bunlar; enjeksiyon, kolon, kolon fırını ve dedektör kısımlarıdır.

Gaz kromatografisinde cihaza numune enjekte edilirken enjeksiyon sistemi için iki duruma dikkat edilmelidir. Gerçekleştirilen enjeksiyon analiz esnasında kolonda bant genişlemesine yol açmamalı ve numunede bulunan hedef bileşenler kolonda herhangi bir kalitatif ve kantitatif değişim uğramadan ilerlemelidir. Hedef bileşiklerin analizi için değişik türlerde enjektörler bulunmaktadır. Kullanılan enjektörler evrensel ve seçici olarak iki türe ayrılır. Evrensel enjektörler direkt, split-splitless, soğuk-kolon üstü ve sıcaklık programlı olarak çeşitlere ayrılırlar (Sandra, 2004; Akyüz, 2007).

Enjeksiyon sisteminde en çok split-splitless enjeksiyon tipi kullanılmaktadır. Gaz kromatografisinde kapiler kolon kullanıldığında numune miktarının az olması gerekmektedir. Bant genişlemesini önlediğinden dolayı split enjeksiyon tipi yaygın olarak kullanılmaktadır. Enjeksiyonda kullanılan iki enjeksiyon valfi yardımı ile buharlaşma kısmında taşıyıcı gaz ve gaz haline geçen numune ile taşıyıcı gaz karışımının akışı ayarlanır. Enjeksiyon bloğunda sıcaklığı 200-320 °C'ye kadar ısıtılan 6-12 cm uzunluğunda 3-4 mm çapında cam veya kuartz içinde cam pamuklu veya cam pamuksuz tüp (liner) kullanılmaktadır. Split (belirli oranda bölme) modunda enjeksiyon yapılan numune kolona gönderilmeden önce belirlenen miktarı bölünerek sistemden dışarı atılır ve kalan kısım kapiler kolonda ayırma uğrayarak analiz gerçekleştirilir. Bu durum, bazen duyarlılığın düşük olmasına yol açabilir. Bu nedenle duyarlılığı arttırmak adına, aynı numune için analiz tekrardan splitless (bölmeden) modu kullanılarak yapılır ve numunenin tamamının kolona gönderilmesi sağlanır.

Gaz kromatografisinde ayrımlar için dolgulu kolonlar ve açık boru veya kapiler kolonlar olarak iki tür kolon kullanılmaktadır. Dolgulu kolonlar genelde cam veya metalden yapılmış olup, iç çapları 1-10 mm, uzunlukları 2-20 m arasındadır. Kapiler kolonlar, iç çapları 0,2-0,5 mm, boyları 10-100 m ve ya daha fazla uzunlukta, iç çeperleri 1 mikrometre kalınlığa kadar özel polimer filmlerle kaplanmış kolonlardır. Kolonlar katlanmış veya bir ruloya sarılarak kolon fırınına sığacak boyutlara getirilmiştir(Yılmaz, 2015).

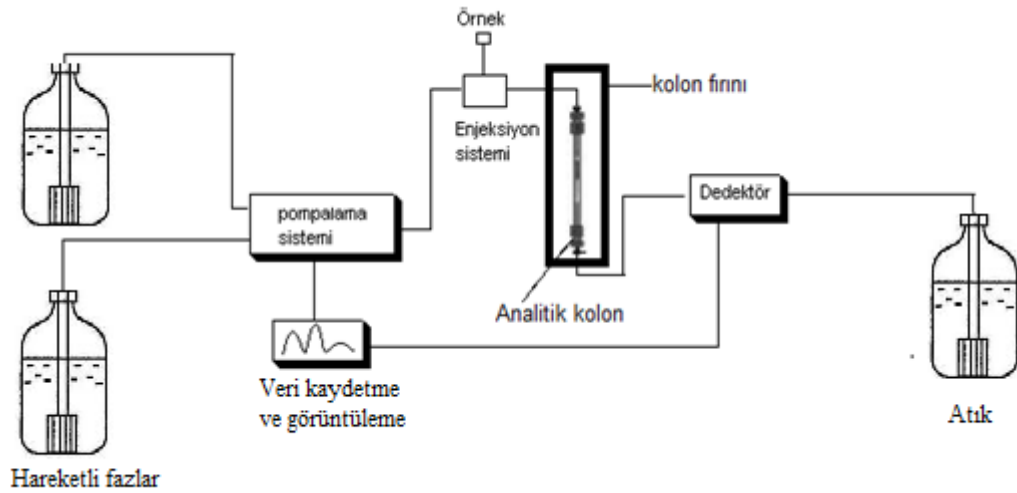
Gaz kromatografisinde yaygın olarak kapiler kolonlar kullanılmaktadır. Kapiler kolonların genelinde içerisindeki metal yüzey erimiş silika ve 350 °C sıcaklığa dayanabilmesi için poliimid polimerik ince film ile kaplanmaktadır. Bu polimer film kaplamanın ince olması bileşenlerin ayrımını artırır ve alıkonma süresini kısaltır. Destek kaplı kolonların kaplama malzemesinden dolayı yüzey alanı artmakta ve analitlerin ayrımı çeper çaplı kolonlara göre daha iyi gerçekleşmektedir. Gaz kromatografisinde ayrılacak analitlerin yapısına göre kolonlarda bulunan sabit faz seçimi gerçekleştirilir. Daha iyi bir ayırım için apolar bileşenler apolar kolonlarda, polar bileşenler polar kolonlarda kullanılmaktadır (McNair ve Miller, 2009). Numunedeki bileşenlerin daha etkili ve hızlı bir şekilde ayrımını gerçekleştirmek için kolon sıcaklığı hızlı bir şekilde artıp azalabilen bir fırın içine yerleştirilir. Kolon fırınının sıcaklığı arttıkça kolonda ilerleyen bileşenlerden kaynama noktası küçük olanlar yüksek olanlara göre daha erken kolonu terk ederler. Bu nedenle sıcaklık bileşenleri birbirinden ayırmak için kullanılan faktörlerden birisidir (Akyüz, 2007).

Dedektörlerin en önemli görevi kolonda ayrılan analitlerin tespitini yapması ve bunlardan elde edilen sinyali kayıt ediciye iletmesidir. Elde edilen sinyal ile analitin miktarı doğru orantılı olarak artmaktadır. Kullanılacak olan dedektörün duyarlılığı, dinamik aralığı ve seçiciliği en önemli özellikleridir (Akyüz, 2007). Gaz kromatografisinde, gerçekleştirilen analizin türüne göre dedektör seçimi yapılır. Kullanılan her bir dedektör amacına uygun farklı bir seçici özellik sunmaktadır. Gaz kromatografisinde alev iyonlaştırma (FID), ısı iletkenlik (TCD), kütle spektrometre

(MS), elektron yakalama (ECD), Azot-fosfor, alev fotometrik (FPD), foto-iyonizasyon (PID) ve Hall elektrolitik iletkenlik dedektörleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkilerde üretilen ve depolanmış şekilde bulunan sekonder metabolitlerin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesinde genelde kütle spektrometre (MS) ve alev iyonlaştırma (FID) dedektörleri kullanılmaktadır. Uçucu (esansiyel) yağların analizinde GC-MS, yağ asitleri analizinde GC-FID ve GC-MS cihazları yaygın olarak kullanılır (Yılmaz, 2015).

2.7.2. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) genelde biyolojik, farmakolojik, gıda, gibi birçok örneğin uygun bir çözücünde çözünmesiyle elde edilen ekstraktların bileşen içerik analizi için hareketsiz ve sıkı gözenekli bir faz içeren kolon içinden, yüksek basınç üreten bir pompadan gönderilen hareketli faz yardımıyla geçirilmesi suretiyle uygulanır. Hareketli faz ile birlikte ilerleyen numunedeki farklı bileşenler kolon içinde bulunan sabit ve gözenekli faza karşı farklı fizikokimyasal etkileşim gösterdiği için ilgileri farklıdır ve bundan dolayı kolonda farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar. Kolonun çıkışına gerçekleştirilen analizin amacına uygun bir dedektör yerleştirilerek farklı zamanlarda kolondan ayrılan bileşikler geliş sırasına göre tespit edilerek bir kaydedicide kaydedilir (Skoog ve ark., 1998). Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminin önemli kısımları hareketli faz depoları, pompa sistemi, enjeksiyon (örnek yükleme), analitik kolon ve kolon fırını, dedektör(ler), kaydedici, atık deposu sistemi şeklinde sıralanabilir. HPLC'nin şematik gösterimi Şekil 2.19'da verilmiştir.



Şekil 2.19: HPLC cihazı akış şeması (Skoog ve ark., 1998).

HPLC’de ayırım, tek çözücü (izokratik) veya birden fazla çözücü karışımının değişen oranlarda (gradiyent) sabit bir hız ile kolondan geçirilmesi ile gerçekleşir. Ayırmalarda seçiciliği arttırmak için çözücü değişimi ve çeşitli yardımcı çözücüler eklenerek en uygun şartlar oluşturulmaya çalışılır. Sistem, hareketli faz depoları, iletim hattı, kolon ve dedektör gibi kısımlarda meydana gelebilecek hareketli fazda çözünmüş gazların oluşturduğu hava kabarcıklarını önleyen degazer sistemi ile donatılmıştır. Mobil faz hattında gazın olması sistemin işleyişini ve mevcut durumu bozar. (Skoog ve ark., 1998).

HPLC’de kullanılan pompa, hareketli fazın yüksek basınç ve sabit hızda akışını sağlar, kromatografik ayırımların daha iyi olması için birden fazla hareketli fazın değişik oranlarda karıştırılması işlemini de yapabilir. Hareketli fazın akış hızı, kolonun iç çapına ve kolonun içinde bulunan dolgu malzemesinin tanecik büyüklüğüne bağlıdır. Eğer kolon çapı ve tanecik boyutu küçük ise akış hızının düşük olması gerekir. Modern bir HPLC sisteminde 0,5-5 mL/dk akış hızı ve 400 bar basınca kadar çıkabilen pompalar kullanılır (Skoog ve ark., 1998).

HPLC sisteminde genelde enjeksiyon valfi kullanılarak numune verme işlemi gerçekleştirilir. Kullanılan bu valfler sistemin akışını çok fazla etkilemeden basınç altında numunenin kolon içine gönderilmesini sağlamaktadırlar. Enjeksiyon valfinin kullanılması ile analizin hızlı, tekrarlanabilir ve yüksek basınçlarda % 0,2'den az hata ile yapılabilmesi sağlanır (Skoog ve ark., 1999).

HPLC ile gerçekleştirilen ayırmalar dağılma prensibine göre gerçekleşir ve hareketli faz ile sabit fazın sahip olduğu polarlık özelliklerine göre iki ana başlıkta ele alınabilirler (Skoog ve ark., 1998). HPLC'de teknik, sabit faz polar, hareketli faz apolar özelliğe sahip ise normal faz (NP) kromatografisi, eğer sabit faz apolar, hareketli faz polar özelliğe sahip ise ters faz (RP) kromatografisi olarak adlandırılır. NP kromatografisinde silika jel gibi polarite derecesi yüksek yapıya sahip olan maddeler sabit faz olarak, apolar yapıda olan hekzan gibi çözücüler hareketli faz olarak kullanılır. NP kromatografisinde kolona tutturulmuş polar yapıdaki dolgu maddesi ile etkileşime giren örneklerin polaritesi arttıkça alıkonma süreleri de artmaktadır. Bundan dolayı polaritesi yüksek olan bileşenler kolonu daha geç terk ederler ve bu farktan dolayı moleküller birbirinden ayrılmış olur. RP kromatografisinde kolona tutturulmuş sabit faz apolar özelliğe sahiptir, hareketli faz su, asetonitril, metanol gibi polar çözücülerdir. RP kromatografisinde apolar moleküller kolonda bulunan apolar sabit fazda daha fazla tutunarak kolondan geç çıkarlar (Snyder ve ark., 2010).

Günümüzde HPLC analizlerinde çoğunlukla RP kromatografisi kullanılmaktadır. RP kromatografisinde sabit faz hareketli fazdan daha apolar olduğu için en polar bileşikler en erken kolonu terk ederler ve hareketli fazın polarlığı arttıkça bileşiklerin sabit faza tutunması azalır. Numunede bulunan moleküllerin hidrofobik özelliği pH'a bağlı olduğundan formik asit, asetik asit ve trifloroasetik asit gibi asidik özelliğe sahip maddeler hareketli faza eklenebilir. Hareketli faza asidik özellik kazandırılması analize göre değişmektedir fakat çoğunlukla bileşenlerin ayrımlarının daha iyi olmasını sağlar (Perrin and Dempsey, 1974; Snyder ve ark., 1997). Bitkilerde üretilen biyoaktif sekonder metabolitlerin çoğunluğu polar yapıli bileşikler olduğu için C18 (n-oktadesil)

dolgu RP kolonları kullanılarak ayrılmaları yaygın bir uygulamadır. Hareketli fazda ise hafif asidik özelliğe sahip asetonitril ve metanol sulu çözeltileri kullanılarak ayırım gerçekleştirilir (Yılmaz, 2015).

HPLC’de kullanılan kolonların içerisinde bulunan, genelde 3-5 μm boyutundaki partiküller, apolar fonksiyonel grupların modifiye edilmesi ile elde edilirler. Analizlerde farklı boyutlarda kolonlar kullanılabilir. Günümüzde genelde 10-30 cm boyunda, 3-5 mm iç çaplı, 3-5 μm tanecik boyutunda sabit faz ile doldurulmuş, birçok çalışma için uygun ayırımı yeterli sürelerde gerçekleştirebilen kolonlar kullanılmaktadır (Akyüz, 2007). Günümüzde ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) tekniğinin gelişmesiyle sıvı kromatografisinde önemli gelişmeler meydana gelmiştir. UHPLC tekniğinde 2 μm ve daha küçük boyuttaki taneciklerin kolon dolgu maddesi olarak kullanılması ve 1300 bar basınca kadar çıkabilen pompa sisteminin kullanılmasıyla analizler daha kısa sürede, yüksek pik etkinliği ve ayırım derecesinde gerçekleştirilmektedir (Zotou, 2012).

HPLC analizlerinde çalışma amacına uygun ultraviyole/görünür bölge dedektörü (Ultraviolet/Visible dedector-UV/VIS) dedektör, diyot serli dedektör (diod-array dedector, DAD), kütle spektrometre (MS), floresan dedektör, refraktif indeks dedektörü (RID), elektrik iletkenlik dedektörü, elektrokimyasal dedektör ve buharlaştırmalı ışık saçılımlı dedektör (ELSD) gibi dedektörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Skoog ve ark. 2007). Son zamanlarda HPLC ile yapılan çalışmaların çoğunda bitkilerde bulunan fitokimyasalların kalitatif ve kantitatif analizlerde UV/VIS, DAD ve MS dedektörleri yaygın olarak kullanılmaktadır. HPLC, bileşiklerde bulunan fenolik bileşiklerin analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Fenolik bileşiklerin analizinde C18 gibi RP özelliğe sahip kolon yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bitkilerde bulunan fenolik asitlerin tespiti çoğunlukla UV-Vis dedektörü ve DAD dedektörler ile gerçekleştirilmektedir (Naczek ve Shahidi, 2004).

Numunede bulunan bileşenler kolondan çıktıktan sonra UV/VIS ışınını geçirebilen bir sıvı akış hücresinden geçirilirler. Numune akış hücresinden belirli dalga boyundaki UV/VIS ışınları geçirilir. Akış hücresinden geçen analitler içinde bulunan ve bu dalga boyunda absorbans yapabilen maddeler tespit edilmiş olur. Belirlenen dalga boyundaki UV/VIS ışını, akış hücresinden geçen analitin yapısını değiştirmez. Sabit ve çoklu dalga boyu ölçebilen iki tür dedektör bulunmaktadır. Sabit dalga boyu dedektörü belirlenen dalga boyunun dışında çalıştırılmazken, çoklu dalga boyu dedektörü dar bir dalga boyu aralığında çalıştırılabilir. Çoklu dalga boyu dedektörü birden çok dalga boyunda absorbans değerlerini belirleyerek daha esnek bir çalışma avantajı sağlamasına karşın hassasiyeti sabit dalga boyu dedektöre göre daha düşüktür.

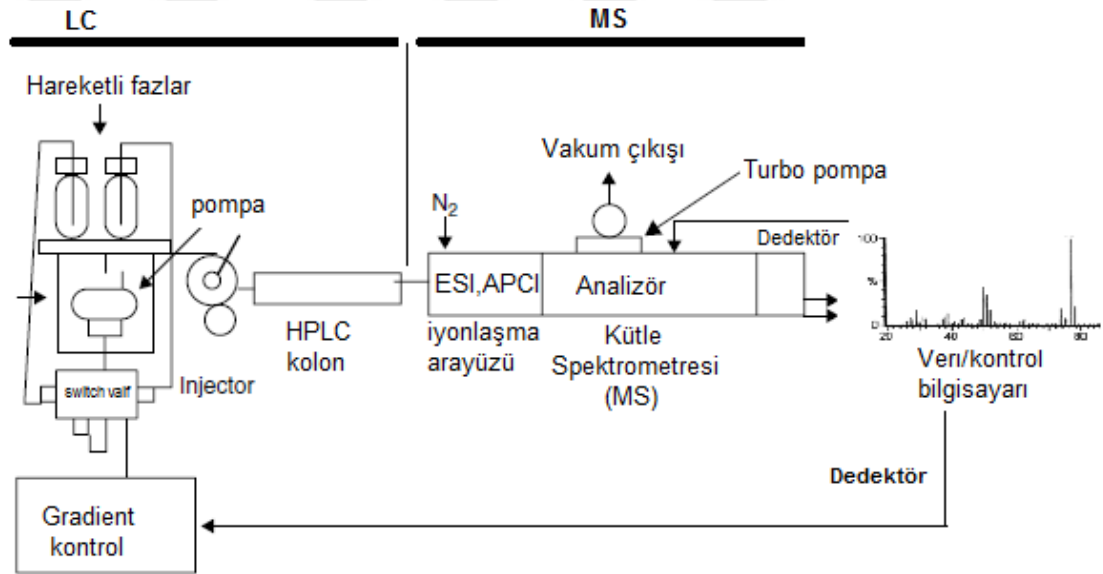
HPLC analizinde hareketli faz ile beraber kolonda gerçekleşen elüsyonlarda bulunan bileşikler UV/VIS dalga boyundaki ışığı absorplayabilir. Bu durumdan dolayı bu dedektörler yaygın olarak kullanılabilir. UV/VIS spektroskopisi kullanılarak bir maddenin molekül yapısı tam olarak bir aydınlatılamamaktadır. Molekül yapının belirlenebilmesi için bileşiğin fragmantasyonlarının ve belirli verilerin olması gerekir. Belirli sınıftaki moleküllerin kendilerine has spesifik absorpsiyon bantları bulunmaktadır. Bu nedenle UV/VIS spektroskopisi bileşiklerde bulunan fonksiyonel grupların varlığı hakkında bilgi verir. Gerçekleştirilen kromatografik ayrımların ardından bileşiğin moleküler yapısını tam olarak aydınlatmak için yapının fragmantasyonların belirlenmesinde kütle spektroskopisi teknikleri kullanılır (Yılmaz, 2015).

2.7.3. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS)

Doğal veya sentetik organik, biyoorganik ve organometalik bileşiklerin yapı aydınlatılmasında ve doğrulanmasında, ayrıca farmakoloji, gıda, adli tıp, çevre çalışmalarında kalitatif ve kantitatif analizlerin gerçekleştirilmesinde kütle spektrometresi (MS) yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MS dedektörler numunelerde

var olan bileşenlerin tespitinde, bilinmeyen bileşiklerin yapı tayininde ve molekül kütlelerinin tayininde sıkça kullanılan bir tekniktir (Watson ve Sparkman 2007; Chiu ve Muddiman 2008).

Sıvı kromatografisi (LC) ile yapılan çalışmalarda analizin tespitinin MS dedektör ile yapılması en uygun analitik seçeneklerdendir. Kolonda birbirinden ayrılan bileşenlerin MS dedektörde iyon haline dönüştürülerek molekül kütleleri belirlenebilir (McMaster, 2005). LC-MS sistemi, sıvı kromatografisi, iyon kaynağı, iyon optikleri, vakum pompaları, kütle analizörü, dedektör, verilerin toplandığı ve kontrolün sağlandığı yazılım birimi ve bilgisayardan oluşur (Şekil 2.20).



Şekil 2.20: Temel bir LC / MS sistemi şematik gösterimi (McMaster, 2005).

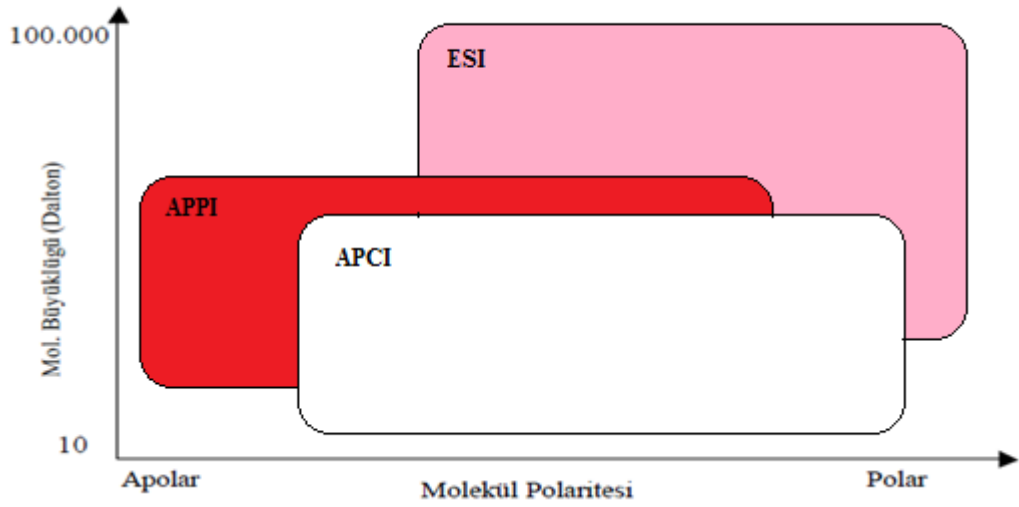
Analitlerin kütlelerinin belirlenmesinde MS yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromatografik ayırım sonrası inert bir gaz yardımı ile püskürtülen numunenin elektron bombardımanı sonucu içeriğindeki bileşiklerin elektron kaybetmesiyle pozitif yüklü iyonlar, elektron yakalaması ile de negatif yüklü iyonlar oluşur. Bu yüklü iyonlar zıt yüklü levhalardan geçirilirken belirli hıza ulaştırılıp bir manyetik alana gönderilir. Manyetik alanda dairesel olarak ilerleyen iyonlar m/z (m : kütle ve z : yük) oranına göre ilerlerler. İyonların m/z oranı küçük olanlar daha küçük çaplı dairesel alanda, büyük

olanlar daha büyük çaplı dairesel alanda yol alırlar. Bu durumdan yararlanılarak farklı/z olan iyonlar birbirinden belirgin şekilde ayrılırlar. Bu yolun sonunda bir dedektöre çarparak elektrik sinyali oluştururlar. Böylece hem iyonlar birbirinden ayrılır hem de miktarları ile doğru orantılı olarak dedektöre ulaşan iyon sayısı kadar elektrik sinyali oluşup, iyonların bolluk miktarı belirlenir (Temel, 2019).

2.7.3.1. LC-MS İyonlaşma Kaynağı

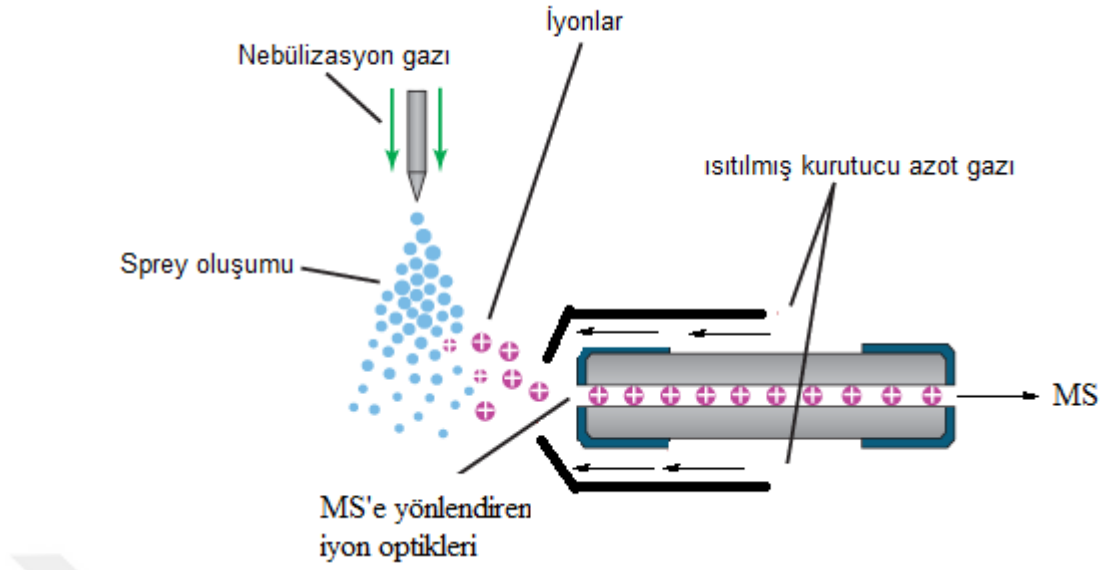
LC kısmından mobil fazla birlikte ayrılarak gelen moleküller bir iyon kaynağında iyon haline dönüşürler. MS için uygulama amacına göre çeşitli iyonlaştırma yöntemleri mevcuttur. İyonlaşma için iki önemli durum vardır. Bunların birincisi iyonlaşan moleküllerin fizikokimyasal özellikleri diğeri ise iyonlaşma süresince verilen iyonlaşma enerjisidir. İyonlaşma kaynakları, güçlü ve yumuşak iyonlaştırma teknikleri olarak iki ana başlıkta değerlendirilir. Güçlü iyonlaştırma teknikleri moleküllerin yoğun parçalanmasına neden olur. Yumuşak iyonlaştırma teknikleri ise daha sade bir şekilde moleküler türlerin iyonlarını oluşturmaktadır. Elektron iyonlaştırma ve kimyasal iyonlaştırma teknikleri sadece gaz fazındaki moleküllerin iyonlaşmasında kullanılmaktadır. Bu tekniklerin iyonlaşmada kullanılabilmesi için analizi gerçekleştirilecek moleküllerin uçucu ve yüksek ısıda karalı olması gereklidir (Hoffman ve Stroobant, 2007).

İyonlaştırma yöntemleri katı ve sıvı numunelere uygulama açısından iki kısma ayrılır. Sıvı numunelerde analit hareketli faz ile beraber iyon kaynağına püskürtülerek damlacıklar haline gelir, atmosferik basınç altında iyonlar oluşarak düşük basınçlı MS analizörüne gönderilir. Elektrosprey iyonlaştırma (ESI), atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma (APCI) ve atmosferik basınçta foto iyonlaştırma (APPI) sıvı numunelerin iyonlaştırılmasında yaygın olarak kullanılan tekniklerdir. İyonlaştırma aşamasında hangi tekniğin uygulanacağına, bileşiklerin polaritesi ve molekül kütlelerine bakılarak karar verilir (Şekil 2.21) (Hoffman ve Stroobant, 2007).

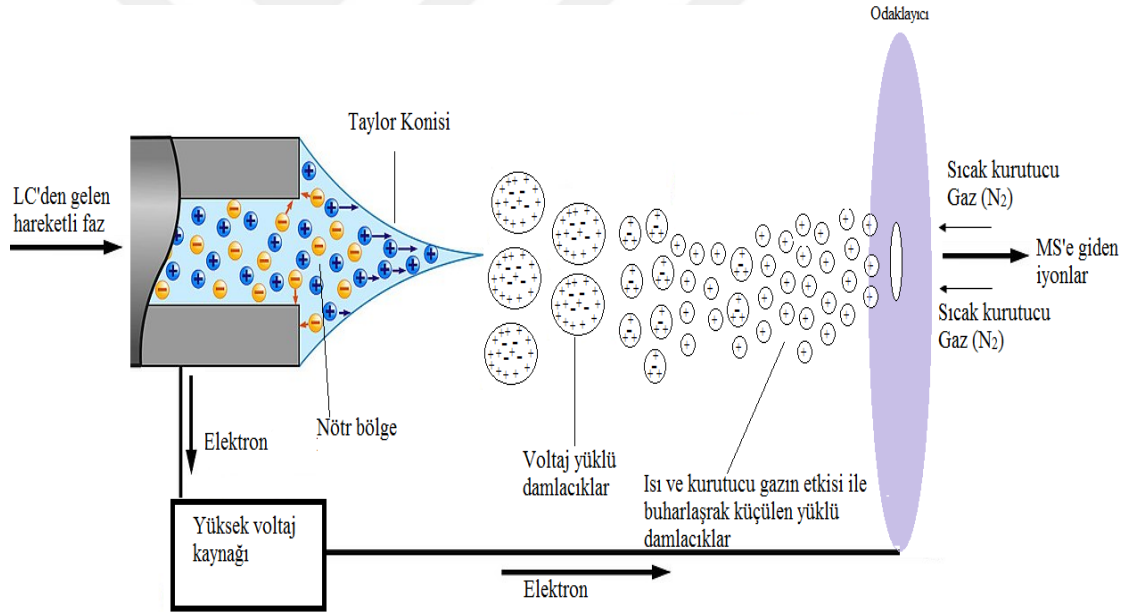


Şekil 2.21: İyonlaştırma yöntemlerinin seçimi (Tsoupras, 2005).

LC-MS cihazında iyonlaştırma kaynakları arasında en yaygın olarak ESI tekniği kullanılmaktadır. LC'den mobil fazla birlikte ayrılıp gelen moleküller, yüksek voltaj yüklü çok ince bir nano-sprey iğneden atmosferik basınç altında püskürtülerek damlacıklar halinde dağıtılır. Nano-sprey iğneye uygulanan yüksek voltaj ile LC'den gelen nötr sıvı haldeki analitler, bu iğnenin ucunda çok sayıda negatif ve pozitif iyonların bir arada olduğu olduğu bir koni (Taylor Cone) meydana getirirler. Bundan dolayı püskürtülen damlacıklar yüklü haldedir. MS giriş kısmının etrafından püskürtülen sıcak azot, gazı yüklü damlacıkların buharlaşarak küçülmesini sağlar. Damlacıklar küçüldükçe "Rayleigh Limiti" olarak da bilinen yüzey gerilimi yük tutamayacak duruma gelir. Akabinde "Kolomb Patlaması" denilen bir olayla damlacıklar parçalanıp serbest halde yüklü iyonlar meydana getirerek MS dedektöre giderler (Şekil 2.23) (Chiu ve Muddimann 2008). ESI, iyonlaşma ara yüzünde kararsız biyomoleküllerin analizinde küçük parçalanmalar oluşturarak uygun hale getiren yumuşak iyonizasyon tekniği olarak bilinir (Grob, 2015).



Şekil 2.22: Elektrosprey iyonlaştırma tekniği (Yılmaz, 2015).



Şekil 2.23: Elektrosprey iyonlaştırma teorisi şeması (Yılmaz, 2015).

LC-MS'de sıkça uygulanan bir diğer iyonizasyon tekniği, 50 ila 2000 $\mu\text{L}/\text{dak}$ arasında tipik akış hızlarına sahip APCI iyonizasyon tekniğidir. Bu teknikte LC kısmından hareketli faz ile ayrılarak gelen analitler, bir azot gazı akışı ile desteklenen ısıtılmış bir tüp içine püskürtülerek nano damlacıklar oluşturulur. İyonizasyon, ısıtılmış tüpün dışına çıkan damlacıkların elektrik yüklü bir korona iğnesi tarafından uyarılması, bu şekilde içeriğindeki bileşiklerin çarpışmalarının ve yük transferinin sağlanmasıyla oluşturulur.

Bu iyonlar sıcak azot gazı ile çözücüsünden tamamen uzaklaştırılarak MS'e gönderilir (Grob, 2015).

LC-MS ve LC-MS/MS analizlerinde hassasiyet iyonlaşma ile doğrudan ilişkilidir. APCI tekniği küçük ve orta molekül kütleli apolar moleküllerin iyonlaşmasında kullanılan etkili bir yöntemdir. ESI ise, polar moleküllerin genelinde ve orta dereceli apolar molekül kütlelerine sahip bileşiklerin iyonlaştırılmasında etkili bir iyonlaşma tekniğidir. ESI tekniği buharlaşması ve iyonlaşması kolay olmayan büyük molekül kütleli biyolojik moleküllerin iyonlaştırılmasında oldukça etkili olarak kullanılan bir yöntemdir. Bundan dolayı, ESI tekniği LC MS/MS analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Grob, 2015).

APPI iyonizasyon yönteminde LC kısmından hareketli faz ile ayrılıp gelen bileşikler bir ısıtıcı yardımı ile gaz fazına dönüştürülür. İyonlaştırma için gaz fazındaki bileşiklere gönderilen UV lamba fotonlarının enerjisi kullanılır. Diğer yöntemlerdeki gibi oluşan iyonlar sıcak azot gazı ile tamamen çözücüsünden arındırıldıktan sonra MS'e gönderilir (Koyutürk, 2019).

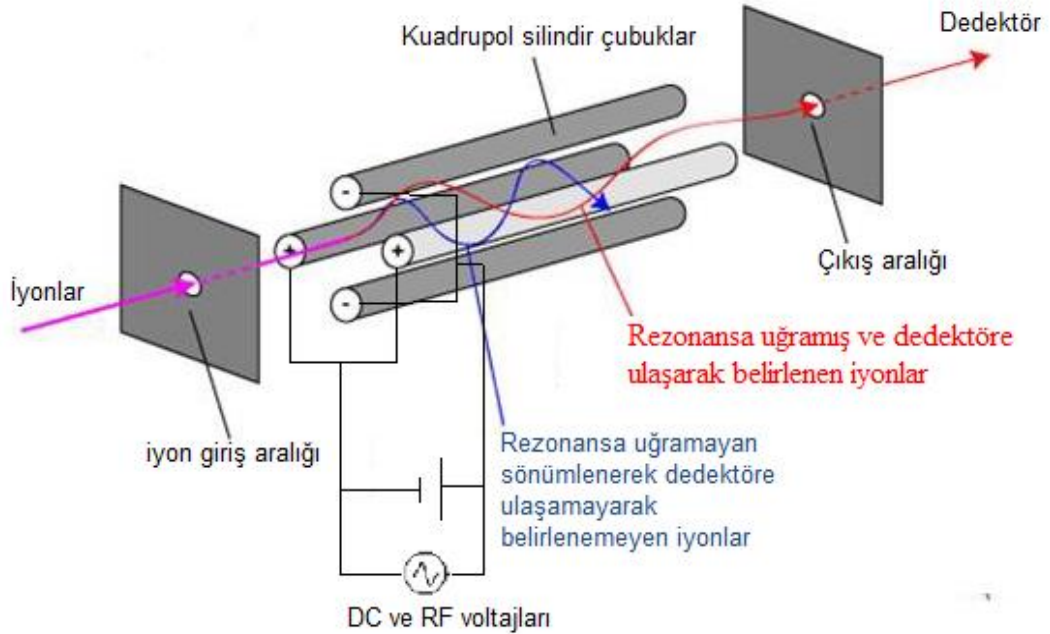
APPI iyonizasyon yönteminde LC kısmından hareketli faz ile ayrılıp gelen bileşikler bir ısıtıcı yardımı ile gaz fazına dönüştürülür. İyonlaştırma için UV ışını üreten lamba yardımı ile oluşan fotonların enerjisi gaz fazındaki bileşiklere iyonlaştırır. Diğer yöntemlerdeki gibi oluşan iyonlar sıcak azot gazı ile çözücünün tamamen uzaklaştırıldıktan sonra MS'e gönderilir (Koyutürk, 2019).

Katı haldeki maddelerin analizinde matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) iyonlaştırma tekniği kullanılmaktadır. Uçucu olmayan analit katı veya viskoz sıvı içerisinde çeşitli örnek hazırlama teknikleri kullanılarak matris hazırlanır. Analiti içeren bu matriks iyonlaşma ara yüzünde lazer kaynağı kullanarak yüksek enerjili ile uyarılır ve oluşan iyonlar MS'e gönderilir (Hoffman ve Stroobant, 2007).

2.7.3.2. LC-MS KütLe analizörleri

MS'in en önemli kısmı olan kütLe analizörleri, iyonlaşma ara yüzünde oluşan iyonların yüksek vakumda hareket ederek m/z oranlarına göre ayrımının gerçekleştiği ve sıralandığı kısımdır. KütLe analizörleri analizin hassasiyetine göre farklı şekillerde sınıflandırılır. Kuadrupol (MS), üçlü kuadrupol (MS/MS), iyon tuzağı (Ion-trap, IT) ve uçuş zamanlı (Time of Flight, TOF) gibi farklı m/z aralığına uygun ve farklı çözünürlüklerde değişik tipleri mevcuttur (McMaster, 2005).

Kuadrupol, dört paralel silindirik çubuktan oluşan kütLe analizörü LC-MS sistemlerinde yaygın şekilde kullanılır. Çubuklara karşılıklı olacak şekilde aynı yükte, komşu çubuklarda zıt yükte olacak şekilde her bir çubuğa doğru akım (DC) ve radyo frekansı (RF) voltajı uygulanır. Kuadrupolde oluşan elektrik ve manyetik alanda sadece istenilen seçilmiş m/z oranına sahip iyonların oluşturulan yolu dairesel bir şekilde izleyerek dedektöre ulaşmaları sağlanır ve diğer iyonlar dedektöre ulaşmadan elenirler (Şekil 2.24) (Grob, 2015).



Şekil. 2.24: Bir kuadrupol kütLe analizörünün şematik diyagramı (Grob, 2015).

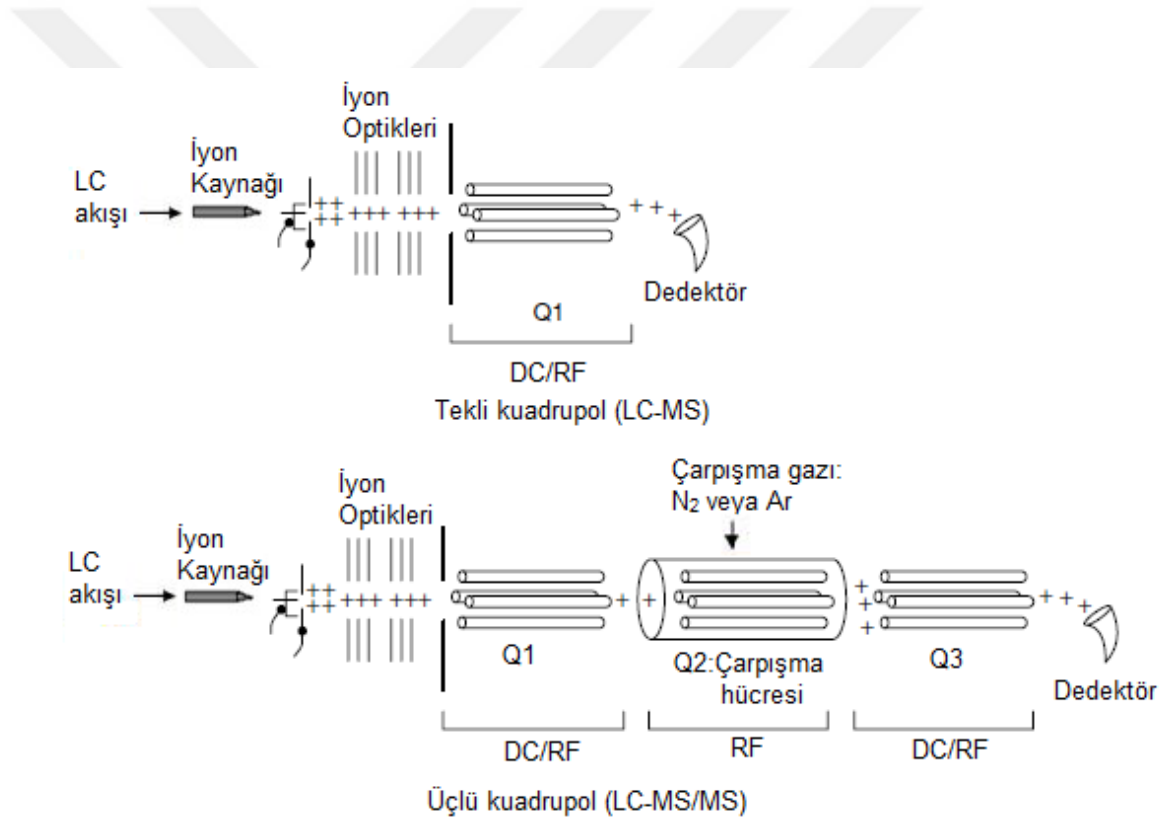
IT kütle analizörüne gönderilen iyonlar bir tuzağın içinde elektrik alan yardımıyla tutulurlar. Tuzakta tutulan iyonlar RF voltajı uygulanarak sıra ile dedektöre gönderilir veya istenilen iyonlar tuzağın içinde hapsedilip alternatif akım yardımı ile daha küçük parçalara ayrılabilir. Bu parçalanma işlemi sürekli olursa, IT analizörleri n sayıda iyon ayrımı ve parçalanma işlemi gerçekleştirdiğinde, bu durum MSⁿ tipi deney olarak ifade edilir. Çeşitli sebeplerle iyon kaybına neden olabildiğinden, kantitatif analizlerde verimleri kuadrupol analizörlerden daha düşüktür (McMaster, 2005).

TOF kütle analizörlerine gönderilen tüm iyonlara aynı anda aynı elektromanyetik kuvvet uygulanarak iyonlar uçuş tüpünde hızlandırılır. Kütlesi küçük iyonlar daha hızlı hareket edeceklerinden dedektöre daha önce ulaşırlar. Bu durumdan yararlanarak m/z oranı uçuş zamanına göre belirlenir. TOF kütle analizörleri geniş bir kütle aralığına uygun oluşu, kütle kesinliği ve hassasiyeti açısından kuadrupol ve diğer analizörlerden daha iyi bir performans sergilemektedir (Yılmaz, 2015).

2.7.4. LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi)

Sıvı kromatografisi ile tekli kuadrupol kütle spektrometresi birleştirilerek çalıştırılan LC-MS ve daha gelişmiş olan üçlü kuadrupol LC-MS/MS sistemleri birçok organik bileşiğin analizinde kullanıldığı gibi, bitkilerde üretilen sekonder metabolitlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde de yaygın bir şekilde kullanılan yöntemlerdendir. LC kısmında analitik kolonda birbirinden ayrılan analitlerin, MS kısmında bir iyonlaşma bölgesinde iyonlaşıp oluşturduğu ana iyonların (moleküler iyon) belirlenmesiyle bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizleri gerçekleştirilir. Ancak, fitokimyasalların birçoğu aynı molekül kütleli olduğundan LC-MS analizlerinde m/z oranları da aynı çıkmaktadır. LC-MS yöntemi ile molekül kütleleri aynı olan fitokimyasalların bazı durumlarda kromatografik olarak da birbirinden ayrılamadıklarında tanımlanmaları ve doğrulanmaları tam olarak gerçekleştirilememektedir. Üçlü kuadrupol LC-MS/MS sistemleri tekli kuadrupol LC-MS sistemlerine göre daha gelişmiş sistemler olduğundan molekül kütlesi ve kromatografik ayrımlarda alıkonma zamanı aynı olan moleküllerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin gerçekleşmesini sağlayarak bu sorunu ortadan kaldırmaktadır (Vogesser ve Kirchhoff, 2011).

LC-MS/MS sistemlerinde iki adet dört silindir çubuğun (kuadrupol) (Q1 ve Q3) çarpışma hücresi olarak kullanılan bir adet dört silindir çubuk (kuadrupol) (Q2) aracılığıyla birbirine bağlanması ile ‘tandem (dizili) kütle analizörü’ olarak da adlandırılan analizörler elde edilir (Şekil 2.25). Çarpışma hücresi olan Q2 (collisioncell), kuadrupol silindirik yapıda dördü, altı, sekizli veya onikili çubuklardan oluşabilir. Q2 kısmında iyonların ayrımı veya taraması yapılmaz. Q2 çubukları arasında bulunan boşluktan kuadrupol yolundaki boşluğa uçan iyonlara inertbir gaz (N_2 , He ve Ar gibi) ve elektrik enerjisi uygulanarak parçalanmaları sağlanır. Q2 kısmında parçalanmanın istenilmediği durumlarda iyonları Q1’den Q3’e iletme işlemini yapmaktadır (Hoffman ve Stroobant, 2007).



Şekil 2.25: LC-MS ve LC-MS/MS cihazlarının şematik gösterimi (McMaster, 2005).

LC-MS/MS sistemlerinde bulunan analizörlerde ana (parent) iyonun m/z oranlarının belirlenmesiyle birlikte ana iyonun ait fragmentleri de belirlenebilir. Ana iyonun ait fragmentler kalitatif analizler için çok iyi bir veri sağlamakla beraber, bu fragmentler kullanılarak yüksek hassasiyetle ve seçicilikle kantitatif analiz de gerçekleştirilebilir. Bu

özelliği ile LC-MS/MS kütle analizörleri, hem yapı hem de miktar analizinde kullanılan önemli sistemlerdir (Hoffman ve Stroobant, 2007).

Üçlü kuadropol (MS/MS) kütle analizörlerinde tam tarama (SCAN), seçilmiş iyon görüntüleme (Selected Ion Monitoring, SIM), seçilmiş reaksiyon görüntüleme (selected reaction monitoring, SRM) ve çoklu reaksiyon görüntüleme (Multiple Reaction Monitoring, MRM) gibi birçok tarama yöntemleri mevcuttur (Grob, 2015). LC-MS/MS cihazında LC kısmında analitik kolondan hareketli faz ile birlikte ayrılıp gelen sıvı haldeki hedef moleküller bir nebulizer ile iyonlaştırma kaynağına püskürtülerek analitler iyonlaştırılır ve bir kapiler boru yardımı ile Q1'e taşınır. Q1'de iyonlar m/z oranına göre ayrılarak istenilmeyen iyonlar atılır.

Analizi yapılacak olan karakteristik ana (parent) iyonlar filtreden ayrılarak tanımlanır. Q1'den geçen parent iyonlar silindirik yapıdaki bir çarpışma hücresi olan Q2'de yüksek saflıkta inert bir gaz (N_2 , He ve Ar gibi) ile çarpıştırılır ve RF uygulanarak ikinci bir parçalanmayla farklı kütleli ürün (product) iyonlar oluşturulur. Gerçekleşen bu olay çarpışmaya bağlı ayrışma (Collision Induced Dissociation, CID) olarak adlandırılır. Q2'de oluşan ürün iyonlardan sadece belirlenen ürün iyonların Q3'e geçmesine izin verilir ve diğer iyonlar dışarı atılır. Q3'ten filtre edilen ürün iyonlar dedektöre ulaşarak hem kalitatif hem de kantitatif analizleri yapılır. İlk parçalanmada oluşan ana iyonların çarpışma hücresinde ikinci defa parçalanarak oluşturulan karakteristik ürün iyonların izlenme işlemine "Çoklu Reaksiyon İzleme" (Multiple Reaction Monitoring, MRM) adı verilir. Analizde oluşan ürün iyonların sayısı MRM işleminin duyarlılığının belirler. Q3'ten filtrelenerek geçen iyonlar dedektöre gelerek buradaki algılayıcılar tarafından sinyale dönüştürülür ve kayıt edilirler (Anılanmert ve ark., 2016: McMaster, 2005: Grob, 2015, Yılmaz, 2015).

LC-MS/MS sistemlerinde bulunan analizörlerde tek bir m/z geçişinin seçilmiş reaksiyon görüntüleme (selected reaction monitoring, SRM) ile izlenmesi yapılabildiği gibi, çoklu m/z geçişlerinin de çoklu reaksiyon görüntüleme (Multiple Reaction Monitoring, MRM) yöntemiyle izlenmeleri gerçekleştirilebilir. Bilinen bir molekülün ana iyon ve fragment iyon çifti o moleküle özgü olduğundan çok sayıda iyon çifti izlenip kayıt altına alınarak

analiz seçiciliği artırılmış olur. Kütle spektroskopisinde belirli bir molekülün fragmentlerinin bolluğu o moleküle özgü olup, molekülün doğru belirlenmesi için izlenmesi gereken bir durumdur. Ayrıca, analizi gerçekleştirilecek hedef analitin LC kısmındaki alıkonma zamanı ile MS analizöründe oluşan fragmentasyonlar birlikte değerlendirildiğinde, kesinliği yüksek oranda olan bir analiz gerçekleştirilir (Grob, 2015). Üçlü kuadropol (MS/MS) kütle analizörlerinin tekli kuadropol (MS) analizörlerinden en önemli üstünlüğü, MRM modunda çalışabilmesidir. MRM modu ikili kütle filtresi gibi çalışarak kantitatif analizlerde gürültüyü önemli ölçüde azaltmakta ve yüksek derecede hassasiyet ve seçicilik imkanı sunmaktadır (Yılmaz, 2015)

2.8. Lipitler

Lipitler suda çözünmeyen organik bileşikler olarak bilinirler ve katı-sıvı yağlar, gliseridler, yağ asitleri, fosfatitler, mumlar gibi sabunlaşabilen bileşiklerle birlikte hidrokarbonlar, büyük molekül kütleli alkoller, steroller, pigmentler ve antioksidanlar gibi sabunlaşamayan organik maddeleri de kapsamaktadır. Lipitlerin yapısında C,H ve O elementleri bulunur fakat O miktarı protein ve karbonhidratlara göre daha azdır. Lipitler suda çözünürlükleri düşük fakat eter, benzen, kloroform ve alkol gibi organik çözücülerde çözünürlüğü yüksektir. Lipitler diğer organik maddelere kıyasla daha yüksek enerjili olması ve 1 gram lipid'in yanması sonucu yaklaşık 9 kcal'lik ısı açığa çıkmaktadır (Saldamlı ve Kayahan, 2005).

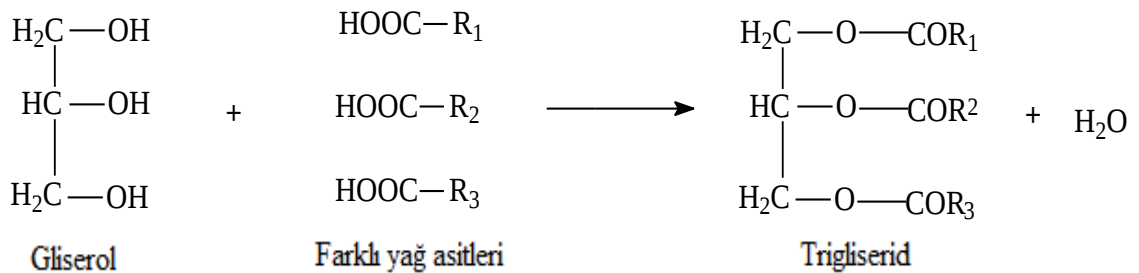
Lipitler üç grupta değerlendirilmektedir bunlar;

1. Basit yapılı Lipitler: Yağlar, mumlar, triterpenik alkol esterleri, sterollerin esterleri, renk verici mumular.
2. Bileşik yapılı lipitler: Şeker içeren lipitler (Serebroglukozitler ve Sulfatitler), lipoproteinler, fosfor ve azot bulunduran lipitler (Lesitin ve Sefalin)

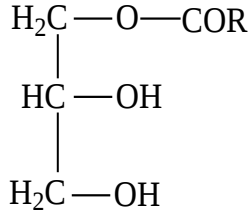
3. Lipitlere benzeyen maddeler: tat ve koku veren maddeler, yağda çözünen renk verici maddeler, yağda çözünen vitaminler, antioksidanlar, hidrokarbonlar ve büyük molekül kütleli alkolleler olarak sınıflandırılır (Saldamlı ve Kayahan, 2005).

Yağlar canlılar için önemli enerji kaynağı olan maddelerdir. Ayrıca önemli hormonların ve bazı vitaminlerin organizmalarda biyosentezinde, hücre zarı ve çeşitli mebranların yapısında ve yağda çözünen A, D, E, K vitaminlerinin dokulara ve organlara taşınmasında kullanılmaktadırlar. Yağlar, canlı yapısını ısı, ışık ve dışarıdan gelebilecek fiziksel etkilere karşı korurlar. Yağlar zayıf bağlarla proteinlerle bağlanarak lipoproteinleri, karbonhidratlara bağlanarak glukolipitleri meydana getiriler. Yağlar depo edilen dokularda ve kemik iliğinde % 80 bulunurken, yumurta ve beyinde % 7,5-30 aralığında, depo edilmeyen dokularda % 1-10 aralığında bulunmaktadır (Sözbilir ve Bayşu, 2008).

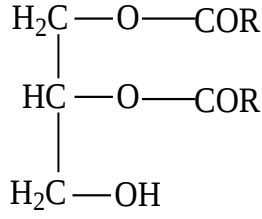
Farklı karbon sayılı ve zincir yapılı yağ asitlerinin gliserolle ($C_3H_5(OH)_3$) esterleşme tepkimesine girmesi sonucu oluşan moleküle- trigliserid (şekil 2.26) adı verilir ve karışımda çok az miktarlarda mono ve digliseridler bulunur (Saldamlı ve Kayahan, 2005). Gliserolün bir tane OH kısmına bir yağ asidinin esterleşerek bağlanması sonucu monogliserid oluşur. Gliserolün iki tane OH kısmına iki tane yağ asidinin esterleşerek bağlanmasıyla digliserid oluşur. Gliserolün üç OH kısmına üç tane yağ asidinin esterleşerek bağlanmasıyla trigliserid oluşur (Şekil 2.27). Değişik kaynaklardan gelen yağları oluşturan gliseridlere bağlı yağ asitleri yağları birbirinden farklı yapmaktadır. Yağları oluşturan yağ asitleri aynı ise basit gliseridler, yağ asitleri farklı ise karışık trigliseridler adını alır (Şekil 2.28) (Turhan, 2006; Can, 1999).



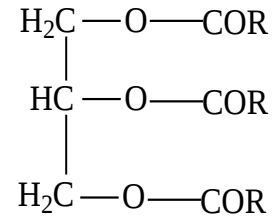
Şekil 2.26: Trigliserid oluşum reaksiyonu.



Monogliserid

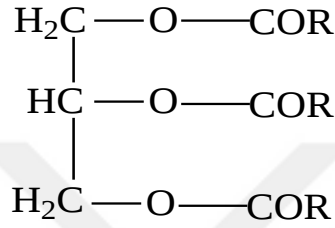


Digliserid

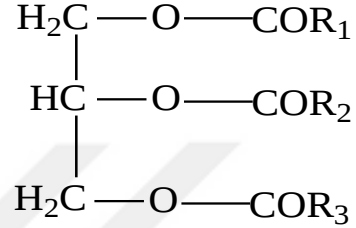


Trigliserid

Şekil 2.27: Monogliserid, digliserid ve trigliserid'in yapısı.



Basit trigliserid



Karışık trigliserid

Şekil 2.28: Basit ve karışık trigliseridin yapısı.

2.8. 1. Yağ Asitleri

Yağ asitleri doymamış ve doymuş yağ asitleri (DYA) olarak iki kısma ayrılır. Doymamış yağ asitlerinin yapısında bir tane çift bağ bulunuyorsa tekli doymamış yağ asitleri (TDYA), birden çok çift bağ bulunuyor ise çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) olarak adlandırılırlar. Memeli hayvanlarda genelde en çok oleat (18:1), palmitat (16:0) ve stearat (18:0) yağ asitleri mevcuttur. Memeli hayvanların tümü doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerini üretebilir fakat ÇDYA'den lineloat (18:2) bitkisel yağlarda, linolenoat (18:3) balık yağlarında yaygın olarak bulunan yağ asitleridir (Kalaycıoğlu ve ark., 1998). Yağ asitlerinden linoleik asit ve linolenik asit insanlar için esansiyeldirler. Günlük alınan besinlerde lineloik asit bulunmaz ise araşidonik asitte esansiyel yağ asidi olarak değerlendirilebilir. Esansiyel olan bu yağ asitleri sağlığa yararlı olduklarından vitamin F olarak da adlandırılmaktadırlar. İnsanlar ve hayvanlar bu yağ asitlerini üretmedikleri için dışarıdan besinlerle almaktadırlar. Gerekli olan bu yağ asitleri yeteri kadar alınmadıklarında bazı deri hastalıkları, büyüme de gerileme, böbreklerde tahribat ve kan kusma gibi önemli sağlık problemleriyle

karşılaşılmaktadır. İnsanların yaşamlarında zihinsel ve fiziksel fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için esansiyel yağları almaları gerekmektedir (Çelebi ve Karaca, 2006).

2.8.2. Doymuş Yağ Asitleri

Çift bağ içermeyen doymuş yağ asitlerinin genel formülleri $C_nH_{2n}O_2$, $C_nH_{2n+1}COOH$ veya $R-COOH$ olarak gösterilir. Doymuş yağ asitlerinde bulunan hidrokarbon zincirindeki tekli bağlar kendi etrafında dönebildiği için esnek özelliğe sahiptirler. Bundan dolayı birçok konformasyon şekline sahiptirler. Yağ asitlerinin ilk on üyesi oda sıcaklığında sıvı halde ve uçucu özelliktedir. Karbon sayısı on iki ve daha yüksek karbon zincirli doymuş yağ asitleri vücut sıcaklığında katı halde bulunurlar. Karbon sayısının artmasıyla erime ve kaynama noktaları artmaktadır (Gözükara, 1989;Turhan, 2006). Sudaki çözünürlükleri karbon sayısı arttıkça azalmaktadır. Alkol ve aseton gibi organik özellikteki çözücülerde sıcaklık artışı ile çözünürlük de artmaktadır. Tüm doymuş yağ asitleri asimetric karbon içermediklerinden dolayı optikçe aktif moleküller değillerdir (Saldamlı ve Kayahan, 2005). Doymuş yağ asitlerinden doğada en çok laurik asit (C12:0), palmitik asit (C16:0) ve stearik asitler (C18:0) bulunur (Gürçan, 2001). Doğada bulunan başlıca doymuş yağ asitleri ve bazı özellikleri Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3: Doğada bulunan başlıca doymuş yağ asitleri ve bazı özellikleri. (Saldamlı ve Kayahan, 2005).

Yaygın Adı	Kapalı Formülü	Mol Kütlesi (g/mol)	Donma Noktası °C	Kaynama Noktası °C	Asit Sayısı	Doğada Bulunuşu
Butirik asit	$C_4H_8O_2$	88.1	-8	163.5	636,8	%2,5-4.5 süt yağında
Kaproik asit	$C_6H_{12}O_2$	116.2	-3,4	205.8	483,3	%1-2 süt yağında
Kaprilik asit	$C_8H_{16}O_2$	144.2	16,0	293.7	389,0	%1-2 süt ve %6-8 kakao Yağında
Kaprik asit	$C_{10}H_{20}O_2$	172.3	31,3	270.0	325,7	Süt ve palm yağında
Laurik asit	$C_{12}H_{24}O_2$	200.3	43,5	130.5	280,1	Defne, süt ve palm yağında
Miristik asit	$C_{14}H_{28}O_2$	228.4	54,4	149.2	245,7	Pek çok bitkisel ve hayvansal yağda
Palmitik asit	$C_{16}H_{32}O_2$	256.4	62,9	167.4	218,8	Farklı oranlarda hemen hemen tüm yağlarda
Stearik asit	$C_{18}H_{36}O_2$	284.5	69,6	183.6	197,2	Çoğunlukla hayvan depo Yağlarında

Tablo 2.3 devam

Araşidik asit	$C_{20}H_{40}O_2$	312.5	75,4	205.0	179,5	%3 yer fıstığı Yağında
Behenik asit	$C_{22}H_{44}O_2$	340.6	79,9	306.0	164,7	%1 den az yer fıstığı ve Kolza yağında
Lignoserik asit	$C_{24}H_{48}O_2$	368.6	84,2	-	152,2	%3 den az yer fıstığı ve Kolza yağında
Serotik asit	$C_{26}H_{52}O_2$	396.7	87,7	-	141,4	Bitkisel yağlarda eser düzeyde

2.8.3. Doymamış yağ asitleri

Doymamış yağ asitleri yapılarında bir veya daha fazla çift bağ bulunması ile tanımlanırlar. Eğer doymamış yağ asitlerinin yapısında bir tane çift bağ bulunuyorsa tekli doymamış yağ asitleri (TDYA), birden çok çift bağ bulunuyor ise çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) adını alırlar (Tüzün, 1992). Doymamış yağ asitleri dallanma olmadan düz zincirli olduklarında çift sayıda karbon atomu bulundurulur ve aynı karbon sayılı doymuş yağ asitlerine göre çözünmeleri daha kolaydır. Doymamış yağ asitlerinin aynı karbon sayılı doymuş yağ asitlerine göre erime ve kaynama noktaları düşüktür.

Düz zincir yapılı tüm doymamış yağ asitleri asimetrik karbonu bulunmadığından optikçe aktif değildir. Bir çift bağ içeren ya da birden çok çift bağa sahip bu bağlar arasında en az iki adet tek bağ bulunur ise ultraviyole ışığı soğuramazlar. Fakat, çoklu doymamış yağ asitlerinde bağlar bir çift bir tek şeklinde tekrarlanarak konjuge bir yapı durumunda olan yapılar ultraviyole ışığı soğururlar (Saldamlı ve Kayahan, 2005).

Doymamış yağ asitleri genelde cis konumunda bulunduğu için molekülün burkulmasına neden olur. Doymuş yağ asitleri atmosfer ortamında oksidasyona karşı dirençli olmasına karşın, doymamış yağ asitleri atmosferde bulunan oksijen ile etkileşime girerek okside olurlar. Bu durum yağların tatlarının acılaşmasına yol açmaktadır. Genelde çift bağ sayısının artması ile erime noktası azalmaktadır (Chambe, 1997).

Doymamış yağ asitlerin hidrofobik özelliği doymuş yağ asitlerine göre daha azdır. Ayrıca doymamış yağ asitlerinin karbon sayısındaki artış hidrofobik özelliği

arttırmaktadır. Doymamış yağ asitlerinin cis izomerleri trans izomerlerine göre daha düşük erime noktasına sahiptir. Hayvanlarda ve bitkilerde tekli doymamış yağ asiti olan oleik asit (18:1) yaygın olarak bulunmaktadır (Gürcan, 2001). Doğada bulunan başlıca doymamış yağ asitleri ve bazı özellikleri Tablo 2.4’te verilmiştir.

Tablo 2.4: Doğada bulunan başlıca doymamış yağ asitleri ve bazı özellikleri (Saldamlı ve Kayahan, 2005).

Yaygın Adı	Kapalı Formülü	Asit Sayısı	Donma Noktası °C	İyot Sayısı	Doğada Bulunuşu
Kaproleik asit	$C_{10}H_{18}O_2$	330	-	149	Süt yağında
Miristoleik asit	$C_{14}H_{26}O_2$	248	-4, +4	112	Balık ve balina yağlarında
Palmitoleik asit	$C_{16}H_{30}O_2$	221	0-5	100	Balık, balina, tereyağı ve bitkisel yağlar
Petroselik asit	$C_{18}H_{34}O_2$	199	32-33	90	Şemsiyegil tohum yağlarında
Oleik asit	$C_{18}H_{34}O_2$	199	13	90	Tüm bitkisel ve hayvansal yağlarda yaygın
Vaksenik asit	$C_{18}H_{34}O_2$	199	39	90	Hayvan süt ve depo yağlarında
Erusik asit	$C_{22}H_{42}O_2$	166	33,5	75	Haçlıgiller familyası tohum yağlarında
Selaholeik asit	$C_{24}H_{46}O_2$	153	39	69	Balık yağlarında
Linoleik asit	$C_{18}H_{32}O_2$	-	-	181,2	Bitkisel yağlarda
Linolenik asit	$C_{18}H_{30}O_2$	-	-	278,4	Bitkisel yağlarda
Morpkitik asit	$C_{18}H_{28}O_2$	-	-	367,6	Deniz hayvanları yağında
Araşidonik asit	$C_{20}H_{32}O_2$	-	-	33,5	Karaciğer yağlarında
Sorbik asit	$C_6H_8O_2$	500,4	-	453	Kuşların karaciğerinde
Trikosanoik asit	$C_{18}H_{30}O_2$	201,5	-	274	Kabakgiller familyası yağlarında

2.8.4 Yağ Asitlerinin Sağlık Açısından Önemi

Besinler metabolik olaylar için gerekli olan proteinler, enerji, vitamin ve mineraller içermesinin yanı sıra insan sağlığı için önemli olan omega-3 yağ asitleri, konjuge

linoleik asit, beta karoten, resveratrol, likopen, polifenoller, askorbik asit, selenyum, metilaminoetanol ve alfa lipoik asit gibi birçok maddeyi de içermektedir. Bazı gıdaların hastalıkların ortaya çıkmasında önleyici olması ve bilimsel olarak tedavilerde kullanılması sağlıklı beslenme için gıdaların ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur (Coşkun, 2005). Bu besinlerde bulunan en önemli moleküllerden biride konjuge linoleik asit ve izomerleridir (Kelly, 2001). Konjuge linoleik asit omega-6 yağ asidi olan 18 karbonlu çift bağ bulunduran linoleik asidin konjuge halde bağ konumu ve geometrik izomerlerinin bir arada bulunan karışımı olarak bilinir. Konjuge linoleik asitin yapısında konjuge halde çift bağlar 6,8'den 12,14'e kadar konumlarında bulunurlar. Ayrıca cis-trans geometrik izomer yapıları ile farklı konfigürasyonlar halinde olabilirler. Konjuge linoleik asitin 28 adet izomeri bulunmaktadır. Bu izomerlerden bazılarının biyolojik özellik gösterdiği belirlenmiştir (Banni, 2002).

Omega-3 yağ asidi içeren trigliseridin, toplam kolesterol ve LDL-kolesterol seviyesini düşürdüğü, HDL seviyelerini de arttırdığı belirlenmiştir (Özkan ve Koca, 2006). Omega-yag asitleri bağışıklık sistemi hastalıkları, meme kanseri ve prostat kanseri tedavilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca kalp damar hastalıkları, hipertansiyon, bağışıklık sistemi, alerji ve sinirsel bozuklukları engellediğine yönelik bilimsel çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte görme düzeyinin artırılmasında ve bebeklerin zihinsel gelişimlerinin desteklenmesinde kullanılmaktadır. Yağ asitlerinin şeker hastalarında glikoz düzeyindeki kontrolün saptanmasında etkili olduğu belirlenmiştir. Alzaimer'ı ve depresyonu önlediği, zihni güçlendirdiği, hamilelik ve menapoz dönemlerinde faydalı olduğu bilinmektedir (Kolanowski ve Laufenberg, 2006). Linoleik asit omega-6 yağ asitlerinin kaynağını oluşturmaktadır. Aşırı doymamış omega-6 yağ asitleri deri sağlığı ve yaralanmalarında, gelişen enfeksiyonları önlediği, vücut sıcaklığı ve su oranını düzenlediği bilinmektedir (Karabulut ve Yandı, 2006).

Doymuş yağ asitlerinin düşük karbon sayılı olanları insan yaşamı için önemlidir. Fakat, palmitik asit ve stearik asit gibi karbon sayısı büyük olan yağ asitleri kalp ve damarlar için zararlı olup, düşük yoğunluklu kolesterolün (LDL) artmasına neden olarak kalp krizi riskini yükseltmektedir. Ancak oleik asit kandaki yüksek yoğunluklu kolesterol miktarını (HDL) artırarak kalp krizi riskini düşürmektedir. Çoklu doymamış yağ asidi

olan linoleik asidin membran geçirgenliğinin artırılmasında, kan basıncının düzenlenmesinde ve mineral metabolizmasında önemli görevi olduğu belirtilmiştir (Tvrzicka ve ark., 2011). İnsanlar için elzem olan linoleik ve linolenik yağ asitlerinin beslenme yolu ile alınması gereklidir. Bu yağ asitleri alınmadığında ise çocukların gelişimde aksaklıklara, derinin neminde azalmaya, kolesterol seviyesinin düzensiz olmasına, nörolojik bozukluklara ve kısırlığa neden olabileceği belirtilmiştir (Kremmyda ve ark., 2011).

2.9. Ağır Metaller

Bitkilerin yaşamlarını devam ettirilmeleri için gerekli olan elementler ‘Bitki besin elementleri’ olarak adlandırılmaktadır. Bitki dokularında gerçekleştirilen analizlerde doğada bulunan elementlerin birçoğu bulunmaktadır. Bitkilerin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmek için besin elementlerini almaya çalışsalar da, çevresel etmenlerden dolayı, bitki dokularında aktif olmayan ağır metaller zamanla birikerek besin zincirine dahil olurlar. Bunun sonucunda ağır metal biriken bitkileri tüketen insanlara ve hayvanlara toksik etki gösterirler. Bitkilerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için N, C, K, H, O, Ca, P, S, Mo, Zn, Cu, Mn, Mg, Cl, B ve Fe elementlerin alınması gereklidir. V, Ni, Na, Al, Co ve Si elementleri de bazı endemik bitkiler ve için gerekli olan yararlı elementlerdir (Yıldız, 2003).

Ağır metaller yoğunluğu 5 g/cm^3 ’den ve atom numaraları yirmiden büyük elementlerdir ve periyodik tabloda genelde geçiş metalleri olarak da tanımlanan bölgede yer alırlar. Esas olarak “ağır metal” ifadesi, bilimsel açıdan daha çok çevre kirliliği açısından kullanılan bir terimdir. Ayrıca canlı vücudunda oluşturduğu ve toksik etkiler bağlamında da kullanılır. Doğada bulunan elementlerden çevre kirliliği ve insan sağlığı ile ilişkisi olan en önemli 20 element Be, Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Co, Cu, V, Zn, Mo, Se, Tl, As, Cd, Sb, Ag, Sn, Hg, Pb metalleri olarak ön plana çıkmaktadır. Bu elementlerin bazıları bitki ve hayvanların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olup, belirli miktarı aştığı durumlarda toksik etki göstermektedir (Yıldız, 2003).

Ağır metaller çok düşük miktarlarda dahi toksik olabilmektedir. İnsanlar bu elementleri ağız, solunum ve deri vasıtasıyla vücutlarına alırlar ve herhangi bir müdahale olmadan kendiliklerinden dışarı atılamazlar. Bu nedenle ağır metallerin büyük bir miktarı vücutta birikir ve belirli bir seviyeyi geçtiğinde tiroit, nörolojik rahatsızlıklar, otizm, kısırlık gibi önemli hastalıklara ve hatta ölümlere dahi neden olurlar. Ayrıca ağır metallerin birçoğu karsinojenik etkiye sahip olmalarından dolayı oksidatif DNA tahribatına yol açmaktadır. DNA'sı hasar gören hücre çoğaldığında yeni mutant hücreler oluşmaktadır (Özbolat ve Tuli, 2016).

Besin, su ve hava yoluyla alınan nadir ve bol bulunan metaller olarak insan vücudunda kırk yaşına kadar biriken Al, V, Ti, Cr, Sn, Pb, Cd ve Hg gibi elementler sayılabilir. Vücutta biriken her metalintoksik etkileri kendi özelliğine göre değişmektedir. Fakat genelde bütün metaller birden çok organı ve sistemi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu duruma enzimleri inhibe eden Hg ve As örnek verilebilir. Bu metaller enzimlerdeki sülfhidril grubunu bloke ederek etkinlik gösterirler. Cd en hassas organ olan böbrekler, karaciğer ve akciğerleri olumsuz olarak etkilemektedir. Ayrıca ağır metallerin toksisitesi doğada bulunduğu yükseltgenme basamağına göre (Cr^{+3} , Cr^{+6} gibi), sudaki ve diğer çözücülerdeki çözünürlüklerine bağlı olarak değişmektedir. Toksisitesi yüksek olan ağır metallerin başında Cd, Hg ve Pb gelmektedir (Güven, 1999).

Çeşitli bitkisel ürünlerdeki arsenik ve diğer bazı toksik metaller için kullanılan ülke sınır değerleri Tablo 2.5'te gösterilmektedir. Ülke rakamları ulusal sağlık yetkilileri tarafından sağlanan bilgilere dayanmaktadır (W.H.O., 2007)

Tablo 2.5: Bitkisel ilaçlar ve ürünlerdeki arsenik ve toksik metaller için ulusal sınır örnekleri (W.H.O., 2007).

		Arsenik (As)	Kurşun (Pb)	Kadmiyum (Cd)	Krom (Cr)	Cıva (Hg)	Bakır (Cu)	Kurşun metallerinin toplam toksisitesi
Bitkisel ilaçlar için								
	Taze bitki	5ppm	10ppm	0,3ppm	2ppm	0,2ppm		
Kanada	İşlenmiş bitki	0,01 mg/gün	0,02 mg/gün	0,006 mg/gün	0,02 mg/gün	0,02 mg/gün		
Çin	Taze bitki	2ppm	10ppm	1ppm		0,5ppm		20 ppm
Malezya	İşlenmiş bitki	5 mg/kg	10mg/kg			0,5 mg/kg		
Kore Cumhuriyeti	Taze bitki							30ppm
Singapur	İşlenmiş bitki	5ppm	20ppm			0,5ppm	150 ppm	
Tayland	Taze/işlenmiş bitki	4ppm	10ppm	0,3ppm				
WHO önerdiği değerler			10ppm	0,3ppm				
Diğer bitkisel ürünler için değerler								
Ulusal sağlık örgütünün önerdiği değerler (taze bitki)		5 mg/kg	10 mg/kg	0,3 mg/kg	2 mg/kg			
Ulusal sağlık örgütünün önerdiği değerler (işlenmiş bitki)		0,01 mg/gün	0,02 mg/gün	0,006 mg/gün	0,02 mg/gün	0,02 mg/gün		

2.9.1. Metal Analizi için Numune Hazırlama Yöntemleri

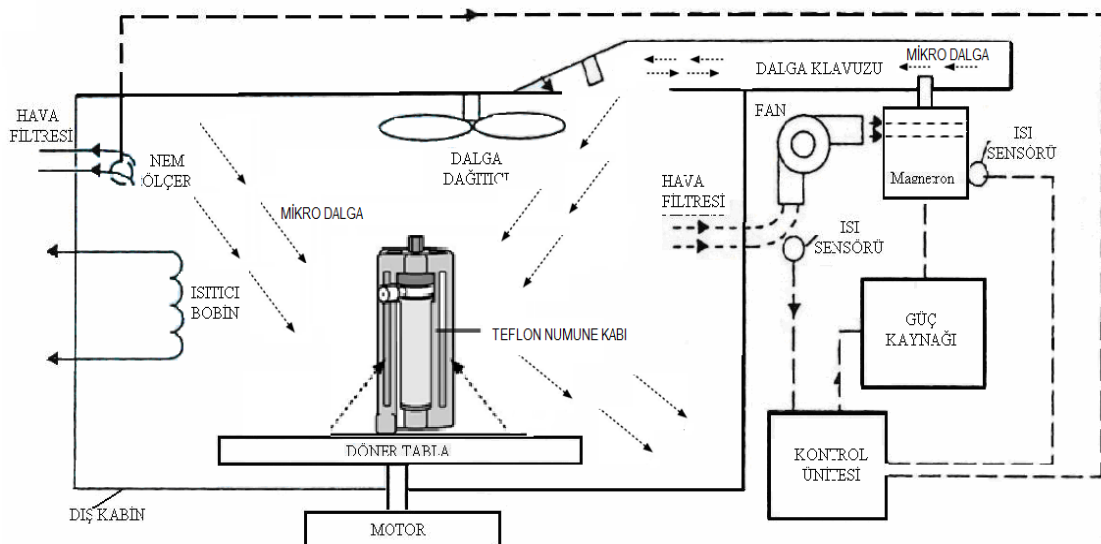
Numunelerde bulunan metallerin analizleri için ilk önce numunede bulunan inorganik ve organik bileşenlerin tümü ya da bir kısmı için belirli oranlarda ve tekrarlanabilir olacak şekilde çözündürme işlemi yapılmalıdır. (Oliveira, 2003). Numunelerden doğru analiz gerçekleştirmek için ön işlem hazırlıkları tüm çalışmanın yaklaşık % 60-80'ni oluştururken, yapılan analizin tüm hatalarının yaklaşık % 30'una neden olmaktadır (Oliveira, 2003; Buszewski ve Szultka, 2012).

Metal analizi için numune hazırlama, analiz cinsine ve istenilen parametrelere göre farklılık göstermektedir. Numunenin uygun bir çözücü veya çözücü karışımında çözünmesi, düşük veya yüksek konsantrasyonda olan metallerin kalibrasyon aralığına alınması için seyreltilmesi veya konsantre edilmesi, matriksten kaynaklanan girişimleri düşürmek için seyreltme yapmak yada ekstraksiyon teknikleri kullanarak hedef metal(ler)i veya matrisi ortamdan çekip alımak gibi numune hazırlama basamakları analiz sonuçlarının doğru ve kesin bir şekilde elde edilebilmesi için sıklıkla uygulanan önemli işlem basamaklarından (Güzelsoy, 2013).

Kuru yakma işleminde, homojen hale getirilen katı numuneler uygun krozeye tartılıp alındıktan sonra kül etme işlemini hızlandırmak için üzerine etil alkol ilave edilerek 400°C’de ön yakma uygulanır. Daha sonra bu krozeler kül fırınına alınarak 500-750°C’de yanma tamamlanıncaya kadar (yaklaşık 2 saat) işleme devam edilir. Krozede ki numunenin tamamen kül olmasına dikkat edilir. Krozeler fırından çıkartılarak oda sıcaklığına kadar soğutulur ve asit veya asit karışımları eklenerek numune çözülür. Ultra saf su ile krozeler yıkanarak numune süzülüp analiz için stok çözelti hazırlanır. Bu yöntemde ihtiyaç duyulan ekipman sadece kül fırını ve uygun krozeler olduğundan birçok numune çeşidine uygulanabilmesine karşın bazı elementlerin yakma sırasında buharlaşması ve kirlenmelerin oluşması bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır. Kuru yakma işlemi gerçekleştirilen krozeler önemlidir. Bu yakma işleminden önce bazı elementler kroze çeperine tutunabilir. Bundan dolayı asit veya asit karışımları ile iyi bir şekilde yıkanmalıdır (Milacic ve Kralj, 2003).

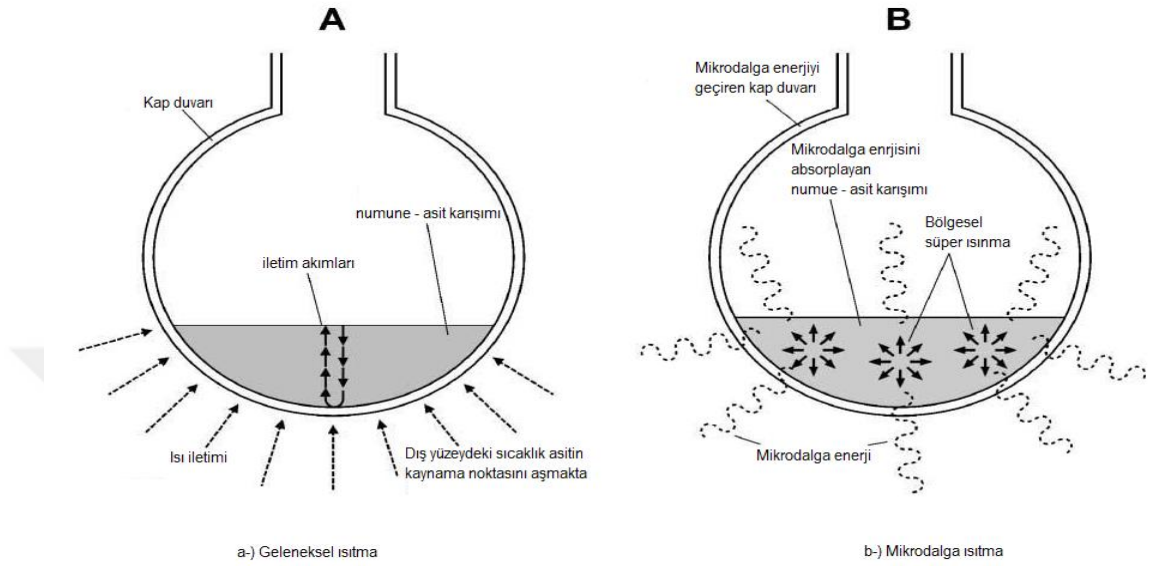
Açık sistem yaşı yakma, açık hava ortamında çözündürme işleminde HCl, HNO₃, H₂SO₄, HClO₄ gibi asitler ile uygun kap (cam, teflon gibi) kullanılarak ısıtma tablası, mantolu ısıtıcı, su banyosu, ultrasonik banyo gibi kontrollü ısıtıcılar ile ısıtılmak suretiyle gerçekleştirilir. Çözündürme işlemi homojen bir çözelti elde edilene kadar sürdürülür. Bu yöntem inorganik ve organik numunelerin hazırlamasında kullanılan yaygın bir yöntemdir. Fazla zaman alıcı olması, uçucu elementlerin kaybı ve fazla miktarda kimyasal tüketimi bu yöntemin dezavantajlarıdır (Güzelsoy, 2013).

Mikrodalga ısıtmasisteminde, açık ve kapalı kaplarda çözündürme işlemi yapılabilir. Bu çözündürme işlemi yüksek sıcaklık ve basınçkoşullarında yapılabildiğinden dolayı kapalı sistem kaplarda gerçekleştirilen çalışmalar daha çok tercih edilmektedir. 1970’li yıllardan beri birçok marka mikrodalga ısıtma cihazı laboratuvar çalışmalarında kullanılmaktadır. Kuru yakma ve yaş yakma numune hazırlama yöntemlerine göre daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi ve çözündürme işleminde daha az kimyasal kullanılmasından dolayı son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Sağladığı kolaylıklardan dolayı doğaya ve laboratuvar çalışanlarına verdiği zarardaha az olmaktadır (Şekil 2.29) (Mester ve Sturgeon, 2003).



Geleneksel iletimli ısı kaynakları ile ilk önce kabın duvarları ısıtılır ve daha sonra bu ısı numuneye ulaşır. Enerjinin numuneye ulaşması kaynaktan kaba ve buradanda numuneye iletimi şeklinde gerçekleşmektedir. Mikrodalga ile çalışan ısıtma

sistemlerinde numuneye gönderilen mikrodalga enerjisi doğrudan numunenin molekülleri ile etkileşmektedir (Güzelsoy, 2013). Geleneksel ısıtma ve mikrodalga ısıtma sisteminin şematik gösterimi Şekil 2.30’de gösterilmiştir.



Şekil.2.30: Geleneksel ve mikrodalga ısıtma sisteminin şematik görünümü (Güzelsoy, 2013).

Mikrodalga ısıtmalı sistemlerde enerji çok kısa sürede doğrudan numuneye iletilmektedir. Mikrodalga enerjisi dipol parçalarının hareketiyle ve iyonik iletimle ısıya çevrilmektedir. Dipol dönüşüm, hızla değişen mikrodalga elektrik alanına bağlı olarak polar moleküllerinin titreşim hareketi sonucu enerji transferi şeklinde gerçekleşmektedir. İyonik özelliğe sahip numunelerde, çözeltide var olan iyonların birbirleriyle elektromanyetik alanda çarpışması sonucu ısı açığa çıkmaktadır (Güzelsoy, 2013).

Mikrodalga ısıtmalı çözündürme işleminde basınca ve sıcaklığa dayanıklı kapalı teflon kaplar kullanılmaktadır. Bu özellikten dolayı buharlaşıp giden maddelerin önlenmesiyle birlikte kimyasal kullanımının az olması, kirliliğin azalması, yapılan çalışmada uygulanan otomasyon programına uygulanabilmesi, çözündürme anında oluşan gazların toplanarak bertaraf edilmesi gibi önemli avantajlar sunmaktadır (Güzelsoy, 2013). Mikrodalga ısıtmalı kapalı sistem yağ yakma yöntemi, toprak, bitki ve gıda gibi

numunelerde bulunan elementlerin belirlenmesi için çözünürleştirme işleminde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Kowalewska, 2005). Geleneksel kuru ve yaş yakma yöntemleri zaman alıcı ve yavaş gerçekleşen işlemlerdir. Bu sebepten dolayı metal analizlerinde daha az zaman alıcı, daha etkili, daha işlevsel ve kabul görmüş bir yöntem olan mikrodalga fırında asitle çözme işlemi daha çok tercih edilmektedir (Tüzen, 2002).

Gelişmiş analiz laboratuvarlarında mikrodalga fırın kullanılarak gerçekleştirilen çözünürleştirme yöntemi eser elementlerin belirlenmesinde gittikçe artan bir şekilde kullanılmaktadır. Buğday, un, deniz ürünleri gibi gıdalar ve çeşitli sertifikalı referans maddelerde gerçekleştirilen eser element ve ultra eser element analizlerinde, diğer çözündürme işlemlerine kıyasla en iyi değerlerin mikrodalga çözündürme yönteminde elde edildiği belirlenmiştir (Senesi ve ark. , 1999; Valiente ve ark., 2002; Mantovi ve ark., 2003)

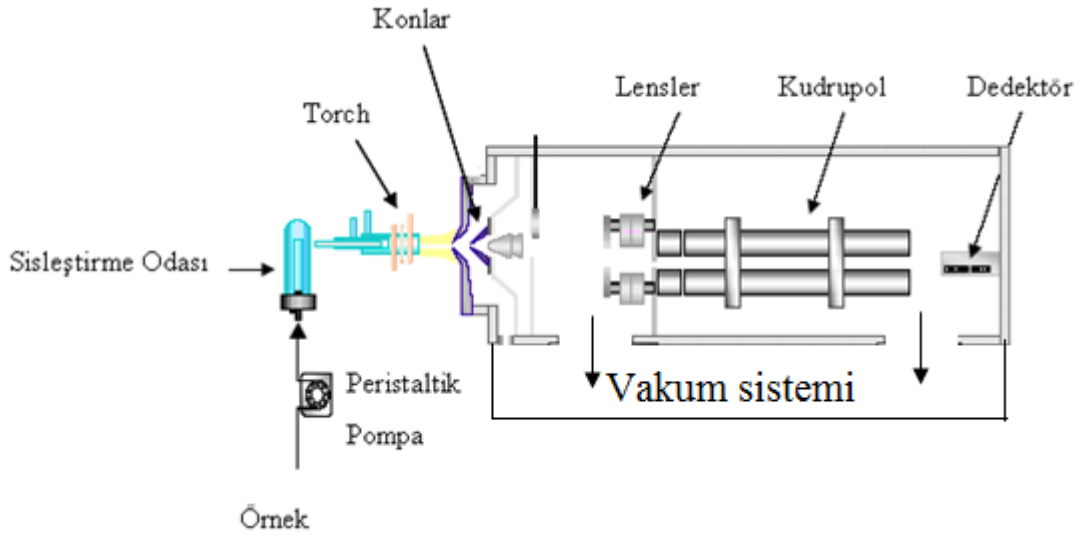
2.9.2. İndüktifleşmiş Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi (ICP-MS)

İndüktif eşleşmiş plazma (Inductively Coupled Plasma, ICP)-kütle spektroskopisi (Mass Spectrometer, MS), kısaca “ICP-MS” olarak gösterilir ve element analizinde yaygın olarak kullanılan bir analiz yöntemidir. ICP-MS tekniği ticari olarak kullanılmaya 1983 yılında başlanmış ve hali hazırda da birçok laboratuvarında etkili bir şekilde kullanılmaktadır. ICP-MS tekniği, ICP-Atomik Emisyon Spektroskopisi (ICP-AES) dahil olmak üzere atomik absorpsiyon ve optik emisyon spektrometrisi gibi diğer elementel analiz tekniklerine göre birçok avantaja sahiptir. Bu yöntemin en önemli avantajı, diğer element analiz yöntemlerine göre çok düşük konsantrasyonlarda tespit olanağı sağlamasıdır. Ayrıca, analizde aynı anda çok sayıda elementin tespit edilmesine olanak sağlaması, izotop oranlarının kolaylıkla tespit edilebilmesi, çalışılan kalibrasyon konsantrasyon aralıklarının geniş olması, kimyasal girişimlerin düşük ölçüde meydana gelmesi gibi birçok avantaj da sağlamaktadır (Elibol, 2009; Devenci, 2012).

ICP-MS elementel analiz yönteminde, ICP kısmında yüksek sıcaklarda numune içerisinde bulunan kimyasal türler parçalanır ve mevcut elementlerin iyonları oluşur. MS kısmında ise, oluşan iyonların belirlenebilmesi için dedektöre ulaşan metal

iyonlarının m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayrılmaları sağlanır. ICP-MS, element analizinde düşük konsatrasyonda gözlenebilme sınırı, yüksek seçicilik, yüksek doğruluk ve kesinlik sunduğu bilinen en önemli analiz tekniğidir (Skoog ve ark., 1998).

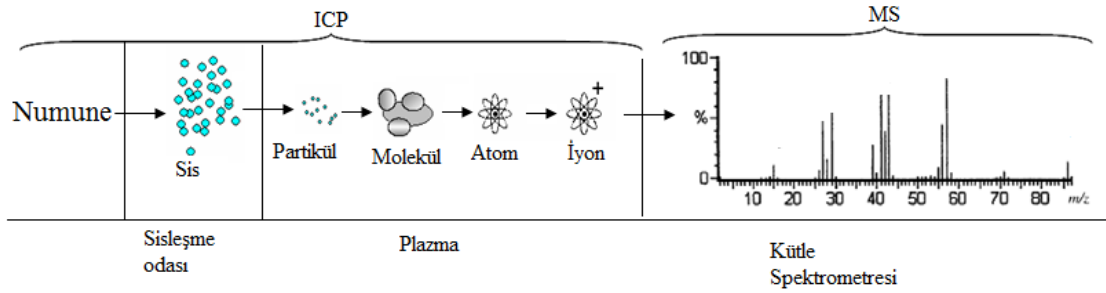
ICP-MS element analiz tekniğinde katı ve ya sıvı numunelerin elementel analizlileri gerçekleştirilmektedir. Bu teknikte Ar gazı kullanılarak torch (meşale) kısmında uyarma kaynağı olan plazma oluşturulur. Ar gazının iyonlaşması sonucu Ar iyonları ve elektronlar meydana geldikten sonra manyetik alan uygulanarak ortamda bulunan Ar iyonları ve elektronlar hızlandırılır. Bu hızlanmanın sonucunda oluşan dirençten kaynaklı ısınma nedeniyle plazma sıcaklığı 10000 K'e kadar yükselmektedir. Oluşan plazma yüksek sıcaklıklara ulaşabildiği için birçok elementin ppb ($\mu\text{g/L}$), ppt (ng/L) türünden konsantrasyonları belirlenebilmektedir. ICP-MS cihazının ana kısımları şematik olarak Şekil 2.31'de gösterilmiştir.



Şekil 2.31: ICP-MS cihazının ana kısımları şematik olarak gösterimi (Agilent Technologies, 2001).

ICP-MS'de analiz gerçekleştirilirken, sıvı fazdaki numune peristaltik pompa vasıtasıyla sisleştirciye (nebulizer) gönderilir. Burada argon gazı ile düşük sıcaklıkta tutulan sisleştirmeye odasının (Spray Chamber) içine sis şeklinde püskürtülür. Burada oluşan aerosoller torch kısmında oluşan plazmada pozitif yüklü iyonlar haline gelir. Ara yüzde bulunan koniler (konlar) vasıtasıyla plazmada oluşan pozitif yüklü iyonlar vakum ortamından dedektöre geçerek odaklayıcı lensler yardımı ile bir araya getirilirler ve

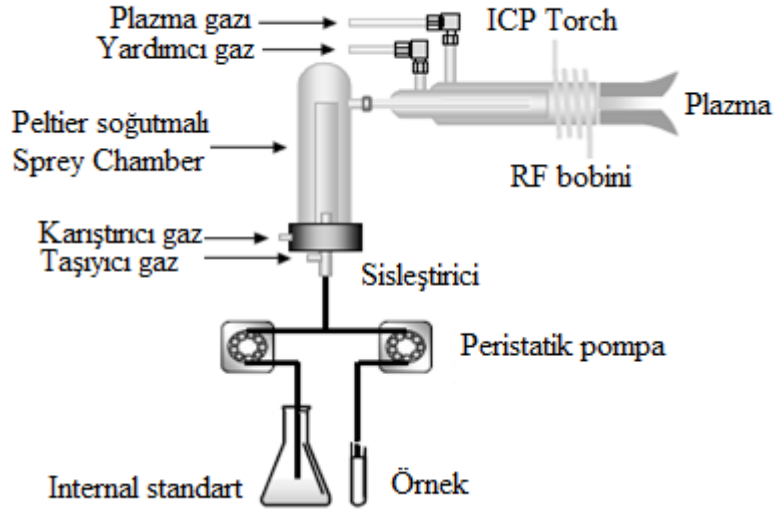
kuadrupolde m/z oranına göre ayrılırlar. Dedektörde tespit edilen veriler bilgisayarda çalıştırılan kontrol programı tarafından kayıt edilir (Aydın, 2008). Şekil 2.32’de analiz edilecek numunenin ICP-MS cihazına verilmesiyle gerçekleşen aşamalar şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.32: ICP-MS cihazında numune analizinde gerçekleşen aşamalar (Agilent Technologies, 2001).

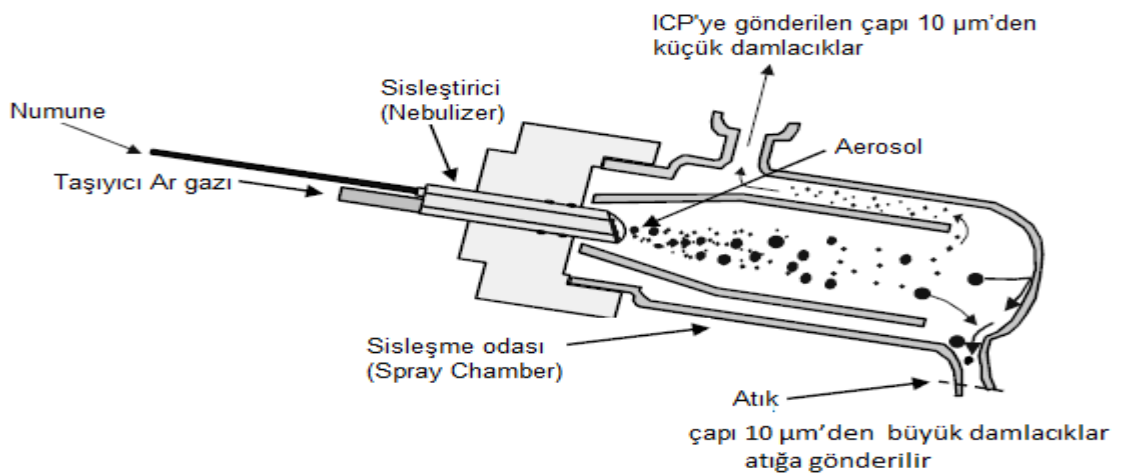
ICP-MS cihazı çevre, su, toprak, yarı metal, katı atık, nükleer yakıt ve radyo izotop, tıp, adli tıp, farmakoloji ve biyolojik örneklerin metal içeriklerinin tayininde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca petrokimya, nükleer sanayi, makine-kimya sanayi, çeşitli madenler, kriminoloji alanlarında ve akademik çalışmalarda kullanılmaktadır (Deveci T., 2012).

ICP-MS cihazında numune girişi sistemi, sıvı numuneleri aerosol (sis) haline dönüştürerek $10\ \mu\text{m}$ ’den küçük olan damlacıkları plazmaya yönlendirmekte, $10\ \mu\text{m}$ ’den büyük damlacıkları da ayırarak dışarı atmaktadır. Sıvı halde bulunan numune sisleştirme odasının (Spray Chamber) içine basınçlı Ar gazı yardımıyla püskürtülerek (nebulizerde) uygun boyuttaki damlacıklar plazmanın olduğu torch’a taşınır (Şekil 2.33) (Agilent Technologies, 2001).



Şekil 2.33: Numune giriş ve torch sistemi (Agilent Technologies, 2001).

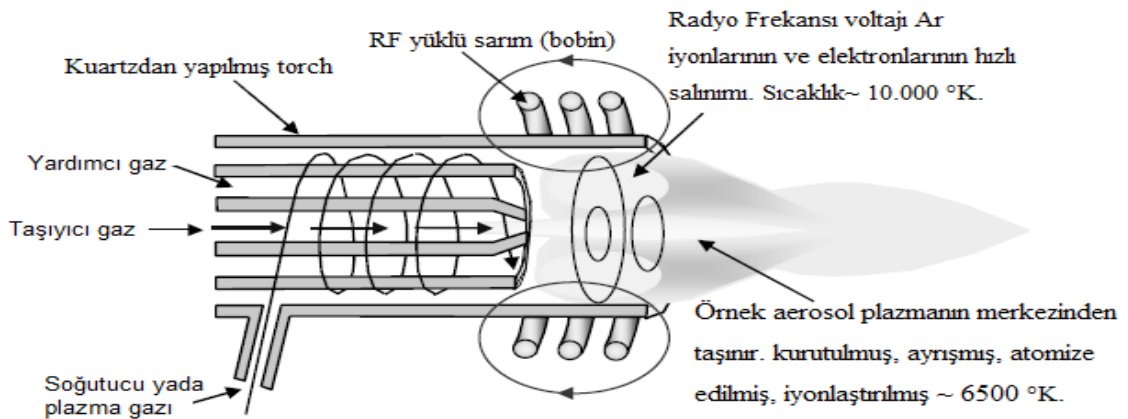
Sulu çözeltilerin analizinde sis odasının sıcaklığı 2 °C'ye kadar soğutulularak plazmaya gidecek oksijen miktarı düşürülür ve ArO gibi oksitlerin oluşumu en az seviyede tutulur. Numune peristaltik pompa ile belirli hızda sisleştiriciye gönderilerek basınçlı Ar gazı ile sis odasına püskürtülür ve küçük damlacıklar oluşturulur. Çapı 10 µm'den küçük olan damlacıklar plazmaya gönderilirken, çapı 10 µm'den büyük damlacıklarda atık kısmına yönlendirilir (Aydın, 2008). Şekil 2.34'te sisleştirme odası (Spray Chamber) ve sisleştirici (nebulizer) şeması verilmiştir.



Şekil 2.34: Sisleştirme odası (Spray Chamber) ve sisleştirici (nebulizer) şekli (Agilent Technologies, 2001).

Kuartzdan yapılmış torch'ta oluşan indüktif eşleşmiş plazma gerçekte bir elektrik yük boşalması olayıdır. Herhangi bir kimyasal olaydan kaynaklı alev değildir. Plazma alev gibi görünse de yanma olayı olamamaktadır. ICP oluşumu, iyonlaşan Ar gazı ve torch'un dış katmanında sarılı olan ve plazma oluşumunu sağlayan indüksiyon bobini ile sağlanır. Bu bobinlere genelde 27 ya da 40 MHz 0,5-2 kW gücünde radyofrekansı (RF) uygulanır. Argon plazması atmosfer basıncında olup sıcaklığı 6500-10000 K aralığındadır. Analizde 10 µm'den küçük numune damlacıkları bu yüksek sıcaklıktaki plazmanın ortasından geçerken enerjinin etkisi ile ayrışma, atomlaşma ve iyonlaşma oluşur. Oluşan bu iyonlar, yönlendiriciler yardımı ile MS'e gönderilir.

Plazma içintorch'un üst kısmında bulunan sarmal yapıda (indüksiyon bobini) oluşturulan elektrik ve manyetik alan yardımıyla üretilen ilk kıvılcımlarla Ar gazından elektronlar kopartılır. Kopan elektronlar manyetik alan tarafından hızlandırılır. Bu başlatıcı elektronlarınsarmal tarafından güçlü radyofrekans uygulanan ortamda enerjileri artırılarak etraflarında bulunan Ar atomlarına çarpmaları sağlanır ve böyleceyeni iyonlaşmalar yolu ile daha fazla elektron oluşumu gerçekleşir. Ar gazının elektronlar ile çarpışması ile gerçekleşen iyonlaşma zincir reaksiyonu şeklinde devam ederek plazma oluşumunun sürekli olması sağlanır. Bu gerçekleşen olaya indüktif eşleşmiş plazma (Inductively Coupled Plasma, ICP) boşalımı adı (Skoog ve ark., 1998; Thomas, 2004; Aydın, 2008; Ha ve ark., 2011; Caner, 2014; Yener, 2017). Şekil 2.35'te ICP-MS'de torch kısmında plazma oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 2.35: ICP-MS'de torch'ta oluşan plazma.

ICP’de oluşan element iyonları kütle spektrometresinde kütle/yük (m/z) oranına göre hızlı bir şekilde ayrılır. İyonlar genelde tek yüklü olduğu için belirlenen oran iyonun kütlesine eşittir. Kütle spektrometrelerinde kuadrupol, uçuş zamanlı ve çift odaklamalı dedektör çeşitleri bulunmaktadır (Skoog ve ark., 1998). ICP-MS’de genelde çoğunlukla kullanılan kütle dedektörü kuadrupoldür (Thomas, 2004). ICP-MS cihazında ETP (Elecron Transfer Photomultiplier) dedektörüne ulaşan iyonlar aktif yüzeyler olan dinodlara çarparak elektron koparırlar. Bu elektron akımı belirli ölçülebilen bir sinyal oluşturur ve bir saniyede sayılan iyon sayısı türünden tespit gerçekleştirilir (Koppenaal ve ark., 2005).

2.10. Çalışma Materyalleri Hakkında Botanik Bilgi

2.10.1. *Amaranthus retroflexus* L. (AR)

Dik görünümlü, 15-100 cm boyunda tek yıllık bir bitkidir. Gövde kısa ve yoğun tüylüdür. Yapraklar 3-7 cm boyunda ve tüysüzdür. Infloresansı yoğun çiçekli yalancı spikalar genellikle braktesiz, uçtaki spikalar yanlardakinden daha uzun değildir. Brakteoller sert ve sivri uçlu, 3-6 mm’dir. Dişi çiçeklerin periantı 5 adet linearcuneat tanspatulata doğru değişir, genellikle retus, kısa mucronulate segmentleri vardır. Meyve buruşuktur. Çiçeklenme dönemi 5-7. aylar arasındır. 1900 m’lere kadar yayılışı görülür. Dünya’da birçok yerde yayılış gösterir. Türkiye’de İstanbul, Bursa, Sakarya, Ankara, Bitlis ve Antalya bölgelerinde bilinir (Davis, 1967). Bitkinin toprak üstü kısmı kurutulup yemeklerde kullanılmaktadır (Fiorito ve ark., 2017). Bitki türkçe yeşil köklü tilki kuyruğu, kaba köklü tilki kuyruğu, yeşil amaranth, yabani pancar, horoz ibiği olarak adlandırılır (Kadioğlu ve ark., 2015).

2.10.2. *Echinops viscosus* DC. subsp. *bithynicus* (Boiss.) Rech f. (EV)

Gövde çok sayıda, dallı, 1,5 m ye kadar veya daha fazla boyu uzar, olukludur, morumsu renkli çok hücreli seta şeklinde glandlaraveylanate tüy durumuna sahiptir. Yapraklar

oblong-lanceolate dan oblonga doğru, 2-3-pinnatisect; laminanın yukarısı aşağı yukarısı yoğun glandular tüylü, aşağısı beyaz lanate ve damarların üstü glandular tüylü; spinleri çeşitli büyüklüktedir. Baş şeklindeki çiçek her gövdede birkaç tane, çapı 10 cm kadar ulaşır. Capitulum 2,5-4 cm; Capitulumdan çıkan fırçamsı tüyler kapitulumdan daha kısa, eşit veya phyllarylerden daha uzun 10-24 mm boyundadır. Phyllaryler 20 mm ye kadar uzar; dıştakiler 12-15 mm boyunda, tüysüz, puberulent veya glandular; ortadakiler 18 mm ye kadar uzar veya uzun dikenli ve 35 mm ye ulaşır; en içteki ortaya yakın bir yerden gevşek bir şekilde bağlanmış 20-33 mm boyundadır. Korolla mavi, açık mavi veya beyazımsı; tüp 10-18 mm; lobları 10-14 mm'dir. Akenleri 7-9 mm dir. Pappusbristleleri boyunun yarısına kadar veya daha fazlasına yapışıktır. Çiçeklenme dönemi nadiren 5-7. aylardadır. 1650 m lere kadar yayılışı görülür. Dünya da Yunanistan, Kıbrıs ve Girit'te yayılıma sahipken, Türkiye'de Çanakkale, İstanbul, Bilecik, Zonguldak, Tokat, Kastamonu, Samsun, İzmir, Eskişehir, Nevşehir, Malatya, Erzincan, Muğla, Isparta, Konya, Adana, Hatay, Şanlıurfa ve Diyarbakır'da yayılış gösterirler (Davis, 1975). Halk arasında topuz (Güneş ve Özhatay, 2011), mor diken olarakta (Sevgi ve ark., 2018) bilinmektedir.

2.10.3. *Lathyrus tuberosus* L. (LT)

Düzensiz olarak sürünen çok yıllık yeşil bir bitkidir. Gövdeleri kanatsız, 30-80 cm boyunda, yumrulu kökleri bulunur. En üstteki yapraklar belirgin bir şekilde tendrilli; yaprakçıklar 1 veya daha fazla çiftli, dar eliptik, düz; stipüller kamamsı, yarı sagittat. Kaliks 5-7 mm; dişleri eşit değil, en alttaki diş kamamsı ve eşit değildir. Taç yaprakları açık pembe, 11-15 mm boyunda. Legüm şeritsi-dikdörtgen, 20-40x4-7 mm, tüysüzdür. Tohumlar 3-6 adet, yüzeyi belirgin bir şekilde tüberküllüdür. Çiçeklenme dönemi 6-8. aylardır. Yetiştigi bölgeler su çayırıları, çimenli alanlar ve nadas alanlarıdır. 1000-2150 m arasındaki yüksekliklerde yayılış gösterirler. Dünyada Kafkasya, Doğu İran, Sibirya ve Orta Asya'da yayılım gösterirken, Türkiye'de; Ankara, Erzurum, Kars, Van, Konya, Kahramanmaraş ve Hakkari'de yayılış gösterirler (Davis, 1970). Halk arasında yöresel

ismi koş koz olarak bilinir. Çiçek, yaprak, meyve ve toprak altındaki yumrusunun kabuğu soyularak taze olarak tüketilmektedir (Güneş ve Özhatay, 2011).

2.10.4. *Chenopodium foliosum* Asch (CF)

Tek veya çok yıllık tüylü ve dik görünümlüdür. Dip yaprakları triangular dan hastate'a doğru veya rhombic'dir. Çiçekler sapsız, yoğun, yuvarlaktır. Braktelerlinear-lanceolate, en üsttekiler braktesizdir. Periant segmentleri, ilkin yeşil renkli, daha sonra kırmızı ve meyvesi kırmızı renkli görünür. Tohumlar vertical, koyu kırmızı-kahve renkli, düz veya kenarları büyümüş, yoğun bir şekilde benekli çukurludur. Çiçeklenme dönemi 5-7. aylar arasındadır. 1200-2800 metre arasında yayılış gösterirler. Asya, Afrika ve Avrupa da yayılışı görülür. Türkiye'de Zonguldak, Ankara, Samsun, Ordu, Kütahya, Nevşehir ve İçel de yayılışları görülmüştür (Davis, 1967). Yöresel halk dilinde cülek (Eker ve ark., 2015) ve it üzümü olarak bilinen bitkinin meyveleri çiğ olarak tüketilmektedir (Aksakal ve Kaya, 2008).

2.10.5. *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent (CP)

Gövdenin içi boş, tüysüz, diktir. Yaprakların kenarı dişli, yuvarlağımsı-yuvarlak arası, laminanın tabanını çevreleyen bir sinüs vardır. Periant kısımları sarı-altın sarısı arası, 7-9 adet, şekilleri farklıdır, eliptik ovat veya obovat görünümlü, 18-23 mm boyundadır. Foliküller yeşilimsi 12-16 mm boyunda, gagalı ve 1-4 mm'dir. Çiçeklenme dönemi 4-7. aylar arasındadır. Dünyada Bulgaristan, Kuzey ve Kuzey Doğu İran da yayılış gösterirken, Türkiye'de Kastamonu, Gümüşhane, Bayburt, Artvin, Kars, Niğde, Tunceli, Erzurum, Van ve Hakkari'de yayılış görülür (Davis, 1965). Halk arasında yöresel ismi lilipar, bizbizik olarak bilinir. Tüm kısımları kavrularak veya çorbası yapılarak tüketilmektedir (Güneş ve Özhatay, 2011).

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Malzeme, Çözücü, Reaktif ve Standart Maddeler

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) reaktifi, Folin-Ciocalteu reaktifi (2N), Neokuproine, Bakır(II) klorür dihidrat, Ferulik asit, protokatekaldehit Fluka (Almanya) firmasından, potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$), selüloz (toz halinde), askorbik asit, benzoik asit, epigallokateşin gallat gallik asit, gentisik asit, kafeik asit, katekhin hidrat, klorojenik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, *p*-kumarik asit, protokatekuik asit, vanilin, rosmarinik asit, salisilik asit, sinapik asit, siringik asit, siringaldehit, vanillik asit, 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2 karboksilik asit (Troloks), metanol (HPLC derecede), etanol (HPLC derecede) asetonitril (HPLC derecede), donar asetik asit, sodyum hidroksit, sodyum klorür, hidroklorik asit (%37), nitrik asit, n-hekzan, isopropanol, TPTZ (2,4,6-tri[2-pridil]-s-triazin Sigma (Almanya) firmasından, amonyum asetat Riadel-de haën (Almanya) firmasından, sodyum karbonat, sodyum asetat trihidrat ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$), sülfirik asit Merck (Almanya) firmasından, ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) %99,11 (HPLC) CHEM-IMPLEX firmasından, 10 µg/mL derişimli multi element ve 10 µg/mL derişimli Hg ICP-MS standartları PerkinElmer firmasından temin edilmiştir.

3.2. Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Çalışmada, CHRİST ALPHA 1-2 LD plus (Osterode am Harz, Almanya) marka liyofilizatör SARTORIUS CP 224s analitik terazi, METTLER TOLEDO XP 6 mikro analitik terazi, BRAND TRANSFERPETTE marka otomatik mikro pipetler (20-200 µL ve 100-1000 µL), EPPENDORF (Almanya) marka otomatik mikro pipetler (5000 µL ve 10000 µL), YELLOW LINE model vorteks cihazı, Azot gazı ve tüpü, HANNA model pH metre, IKA A11 BASIC model değirmen, RETSCH AS 200 model elek, HEIDOLPH LABORAT 4000 evaporatör, IKA evaporatör, BANDELIN SONOREX

model 50/60 Hz 180/640 watt (Almanya) ultrasonik banyo, JASCO V-650 UV/VIS spektrometre (Tokyo Japonya), Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC-MS/MS(USA), GC-FID/MS (Agilent 7890A GC / 5975C MS Series-Santa Clara, CA, USA), CEM marka MARS6 ONE TOUCH (USA) model mikrodalga parçalayıcı fırın, ICP-MS (NexION® 2000 PerkinElmer® Inc., USA), Ultra saf su cihazı (Human power I, Güney Kore), Biotage marka azot altında uçurma, GERHARD orbital çalkalayıcı, MEMMERT marka etüv 1 cm'lik 1,5 mL'lik kuvars küvetler kullanıldı.

Çalışmada, CHRIST ALPHA 1-2 LD plus (Osterode am Harz, Almanya) marka liyofilizatör SARTORIUS CP 224s analitik terazi, METTLER TOLEDO XP 6 mikro analitik terazi, BRAND TRANSFERPETTE marka otomatik mikro pipetler (20-200 µL ve 100-1000 µL), EPPENDORF (Almanya) marka otomatik mikro pipetler (5000 µL ve 10000 µL), YELLOW LINE model vorteks cihazı, Azot gazı ve tüpü, HANNA model pH metre, IKA A11 BASIC model değirmen, RETSCH AS 200 model elek, HEIDOLPH LABORAT 4000 evaporatör, IKA evaporatör, BANDELIN SONOREX model 50/60 Hz 180/640 watt (Almanya) ultrasonik banyo, JASCO V-650 UV/VIS spektrometre (Tokyo Japonya), Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC-MS/MS(USA), GC-FID/MS (Agilent 7890A GC / 5975C MS Series-Santa Clara, CA, USA), CEM marka MARS6 ONE TOUCH (USA) model mikrodalga parçalayıcı fırın, ICP-MS (NexION® 2000 PerkinElmer® Inc., USA), Ultra saf su cihazı (Human power I, Güney Kore), Biotage marka azot altında uçurma, GERHARD orbital çalkalayıcı, MEMMERT marka etüv 1 cm'lik 1,5 mL'lik kuvars küvetler kullanıldı.

3.3. Numune Hazırlama

Çalışmada kullanılan bitki örneklerinin teşhisleri Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde Prof.Dr. Lütfi BEHÇET tarafından yapıldı ve kurutulmuş bitki örnekleri Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'nda (BIN) saklanmaktadır. Bitkilerin isimleri, toplanma yerleri, toplanma zamanları ve herbaryum numaraları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Bitkilerin isimleri, toplanma yerleri, toplanma zamanları ve herbaryum numaraları.

Bitkinin İsmi ve kısaltması	Toplandığı Yer	Toplanma Zamanı	Herbaryum Numarası
<i>Amaranthus retroflexus</i> L. (AR)	A9: Kars, Kafkas Üniversitesi lojmanları çevresi, step, 40° 34' 966" K 43° 03'850" D, 1759 m, Leg.: DURSUN01, Det.:L. BEHÇET	07.08.2017	BIN5715
<i>Echinops viscosus</i> DC. subsp.	B9: Iğdır, Tuzluca ilçesi kamışlı-Karabulak köyleri, arası yol kenarı, step, 39° 59' 769"K 43° 43'462" D, 1301m, Leg.: DURSUN02, Det.:L. BEHÇET	06.08.2017	BIN5714
<i>Bithynicus</i> (Boiss.) Rech. f. (EV)			
<i>Lathyrus tuberosus</i> L. (LT)	A9: Kars, Kafkas Üniversitesi lojmanları çevresi, step, 40° 34' 966" K, 43° 03' 850" D, 1759 m, Leg.: DURSUN03, Det.:L. BEHÇET	07.08.2017	BIN5713
<i>Chenopodium foliosum</i> Asch (CF)	A9:Kars, Kafkas Üniversitesi lojmanları çevresi, step, 40° 34' 966" K, 43° 03'850" D, 1759 m, Leg.: DURSUN04, Det.:L. BEHÇET	07.08.2017	BIN5712
<i>Caltha polypetala</i> Hochst. Ex Lorent (CP)	B9: Iğdır, Kara çomak köyü Güneydoğusu nemli çayır, 39° 45 ' 432 " K, 43° 55' 850"D2200-2234 m, Leg.: DURSUN05, Det.: L. BEHÇET	02.05.2019	BIN6430

AR, EV, LT, CF, CP bitkilerinin toprak üstü kısımları güneş ışığından korunarak en kısa sürede laboratuvar ortamına alındılar. Numuneler doğrudan güneş almayacak şekilde serin ve kuru havada nemi kalmayacak şekilde kurutuldular. Numunelerin bir kısmı ise CHRIST ALPHA 1-2 LD plus marka liyofilizatör kullanılarak nemi kalmayacak şekilde kurutuldu. Bitkilerin resimleri, herbaryum kayıtları Ek Şekil 1-5' te verilmiştir.

Kuruyan numuneler bıçak yardımı ile ilk önce 1-2 cm oluncaya kadar küçültüldü. Daha sonra numuneler IKA A11 BASIC model bir değirmende öğütülerek küçük parçacıklar haline getirildi. Numune parçacıkları RETSCH AS 200 model bir elek sallayıcıda elenerek 125 µm'den küçük, parçacık büyüklüğüne getirildi. Elde edilen numuneler renkli şişelere alındı, şişelerin boş kısımlarındaki hava azot gazı ile değiştirilerek sızdırma olmayacak bir şekilde kapakları kapatıldı ve +4°C de karanlık bir ortamda

muhafaza edildi. Bitkilerin isimleri ve kurutulma yöntemlerinin kısaltmaları Tablo 3.2’ verilmiştir. Bundan sonra bu kısaltmalar kullanılacaktır.

Tablo 3.2. Bitkilerin isimleri ve kurutma yönteminin kısaltmaları.

Bitkinin İsmi	Bitkilerin Serin ve kuru havada kurutma	Bitkilerin Liyofilizatörde kurutma
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	ARH	ARL
<i>Echinops viscosus</i> DC. subsp. <i>Bithynicus</i> (Boiss.) Rech. f.	EVH	EVL
<i>Lathyrus tuberosus</i> L.	LTH	LTL
<i>Chenopodium foliosum</i> Asch	CFH	CFL
<i>Caltha polypetala</i> Hochst. Ex Lorent	CPH	CPL

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş; EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş; LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş; CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş; CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş; EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş; LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş; CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş; CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.

3.4. Ekstraksiyon Deneyleri

3.4.1. Soxhlet Ekstraktlarının Hazırlanması

Soxhlet ekstraksiyonu (SE) için parçacık boyutu 125 µm’den küçük olan numunelerden 5’er gram 0,1 mg hassasiyetle tartılarak önceden aynı ekstraksiyon çözücüsü ile yıkanan ekstraksiyon kartuşuna alındı. Tüm bitki örneklerinin her biri için hazırlanan kartuşlar 100 mL hacimli Soxhlet ekstraktörüne dikkatli bir şekilde yerleştirildi ve kaynama balonuna 150 mL etanol:su (1:1, v/v) ekstraksiyon çözücüsü ve yeteri kadar kaynama taşı konuldu. 8 saat (30-32 sifon) boyunca ekstraksiyon haznesindeki örnek kartuşundan

renkli sifon gelmeyinceye kadar ekstraksiyona devam edildi. Tüm numuneler için aynı işlemler çözücü olarak HPLC derecede etanol kullanılarak tekrar edildi. SE'ye 8 saat (36-40 sifon) boyunca ekstraksiyon haznesindeki örnek kartuşundan renkli sifon gelmeyinceye kadar devam edildi. SE sonrasında elde edilen tüm ekstraktlar partikül kalmaması için mavi bant süzgeç kağıdından süzüldü ve sabit tartıma getirilmiş darası alınmış temiz bir cam balona alınarak döner buharlaştırıcıda kurutuldu. Daha sonra cam balonun içindeki hava azot gazı ile değiştirilerek sızdırmaz bir şekilde kapağı kapatılarak sabit tartıma gelmesi için desikatöre konuldu.

Etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü ile elde edilen kuru ekstraktların miktarı 0,1 mg hassasiyetle tartılarak belirlendi ve aynı çözücü kullanılarak konsantrasyonu bilinen birer stok çözelti haline getirildiler. Aynı işlemler HPLC derecede etanol ile elde edilen kuru ekstraktlara da uygulandı ve tüm stok çözeltiler 100 mL'lik amber renkli bir cam şişe içine alındı. Şişelerin içindeki hava azot gazıyla değiştirilerek kapakları sıkıca kapatıldı ve ileri analizler için +4 °C'de soğutucuda saklandılar.

3.4.2. Ultrasonik Destekli Ekstraktların Hazırlanması

125µm'den küçük parçacık boyutuna sahip numunelerin her birinden 250 mL'lik bir erlene 0,1 mg hassasiyetle tartılmış yaklaşık 5'er gram numune ile 100 mL etanol:su (1:1 v/v) ekstraksiyon çözücüsü konuldu ve erlenin ağzı sıkıca kapatılarak BANDELIN SONOREX (50/60 Hz, 180/640 watt Almanya) model bir ultrasonik banyoda 40 dakika süreyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu sırada sıcaklık 25-37°C aralığında olacak şekilde kontrol edildi. Ultrasonik destekli ekstraksiyondan (UDE) elde edilen ekstrakt, partikül kalmaması için mavi banttan süzüldü ve sabit tartıma getirilerek darası alınmış temiz bir cam balona alınarak döner buharlaştırıcıda kurutuldu. Daha sonra cam balonun içindeki hava azot gazı ile değiştirildi ve sızdırma yapmayacak şekilde kapağı kapatılarak sabit tartıma gelmesi için desikatöre konuldu.

Sabit tartıma getirilen kuru ekstraktın miktarı 0,1 mg hassasiyetle tartılarak belirlendi ve tekrar etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü ile çözülerek konsantrasyonu bilinen bir stok çözelti haline getirildi. Bu şekilde elde edilen konsantrasyonu ve hacmi bilinen stok çözeltiler, ışık almayacak şekilde 100 mL'lik amber renkli cam şişeler içine alındı. Şişelerin içindeki hava azot gazıyla değiştirilerek kapakları sıkıca kapatıldı ve ileri analizler için + 4°C'de soğutucuda saklandı.

3.4.3. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction-ASE) Ekstraktlarının Hazırlanması

ASE işlemleri Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde (AÜBİBAM) Dionex ASE300 cihazında gerçekleştirilmiştir. 125µm'den küçük bitki örneklerinin her birinden 0,1 mg hassasiyetle tartılmış yaklaşık 15'er gram numunenin ekstraksiyonları; etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü ile 100°C'de, 1500 psi basınçta, 100 mL ekstraksiyon hücresi kullanılarak, 10 dakika statik, % 60 flush (yıkama), 90 saniye purge (N₂ ile tahliye), toplam süre 20 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

ASE sonrasında elde edilen ekstraktlarda partikül kalmaması için mavi banttan süzülüler ve sabit tartıma getirilmiş darası alınmış temiz cam balonlara alınarak döner buharlaştırıcıda kurutuldular. Daha sonra cam balonların içindeki hava azot gazı ile değiştirildi. Balonlar sızdırma yapmayacak şekilde kapağı kapatılarak sabit tartıma gelmeleri için desikatöre konuldular.

Kuru ekstraktların miktarı 0,1 mg hassasiyetle tartılarak belirlendi ve tekrar etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü ile çözülerek konsantrasyonu bilinen birer stok çözelti haline getirildiler. Konsantrasyonu ve hacmi bilinen stok çözeltiler ışık almayacak şekilde 100 mL'lik amber renkli birer cam şişe içine alındı. Şişelerin içindeki hava azot gazıyla

değiştirilerek kapakları sıkıca kapatıldı ve ileri analizler için +4 °C’de soğutucuda saklandılar.

3.5. Folin-Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini

0,2 N Folin-Ciocalteu Reaktifi: Hazır satın alınan 2 N’lik Folin-Ciocalteu çözeltisinin saf su ile 1:10 oranında seyreltilmesi ile hazırlandı.

% 7,5’lik (a/h) Na₂CO₃ çözeltisi: 0,1 mg hassasiyetle tartılan 7,5 g Na₂CO₃’ın 100 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

Stok gallik asit çözeltisi (1 mg/mL): 0,1 mg hassasiyetle tartılmış 10 mg gallik asidin 10 mL metanolde çözülmesiyle hazırlandı.

SE, UDE ve ASE’den elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri, Slinkard ve Singleton’un (1977) metodunda küçük değişiklikler yapılarak gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplandı. Gallik asit metanolde çözülerek, derişimleri 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125, 250 ve 500 µg/mL olan 7 adet standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan gallik asit standart çözeltilerinin her birinden 50 µL alınarak 15 mL’lik kapaklı plastik falkon tüpüne konuldu. Daha sonra üzerlerine 2,5 mL saf su ilave edildi. Bu karışıma 0,2 N’lik Folin-Ciocalteu reaktifi çözeltisinden 250 µL ilave edildi ve vorteksle karıştırıldı. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildikten sonra % 7,5’lik Na₂CO₃ çözeltisinden 750 µL ilave edildi. Karışım tekrar vortekslenerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. JASCO V-650 UV/VIS spektrofotometre cihazı kullanılarak 765 nm’de absorbans değeri ölçüldü. Aynı işlemler standart çözeltiler yerine SE, UDE ve ASE ekstraktlarından kendi çözücüleriyle seyreltmek suretiyle hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyonlu çözeltilerden alınan 50 µL’lik kısımlar üzerinde tekrar edildi

$$\Delta A = A_2 - A_1 \quad (3.1)$$

Çalışmada her bir örnek üç defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır. Kör olarak saf su kullanıldı. Saf su absorbansı A1 ve ekstraktın absorbansı A2 olmak üzere

eşitliğinden absorbans farkları hesaplandı (Denklem 3.1). Gallik asit standartlarının derişimlerinin absorbans farklarına karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon grafiği elde edildi. Kalibrasyon grafiği kullanılarak ekstraktların toplam fenolik madde içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g hava kurusu numune $\pm$ standart sapma (SS) olarak verildi.

3.6. Antioksidan Tayin Metodları

3.6.1. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

10^{-2} M Cu(II)klorür çözeltisi: 0,1 mg hassasiyetle $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'den 0,4262 g alınıp çözüldü ve su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

$7,5 \cdot 10^{-3}$ M Neokuproin(Nc) çözeltisi: 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin)'den 0,1 mg hassasiyetle 0,0390 g tartılıp % 96'lık etil alkolde çözüldü ve çözelti hacmi 25 mL'ye tamamlanmak hazırlandı.

1 M Amonyum asetat çözeltisi (pH=7): NH_4Ac 'dan 19,27 g 0,1 mg hassasiyetle tartılıp, çözüldü ve su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

$1,0 \cdot 10^{-3}$ M Troloks stok çözeltisi: 0,1 mg hassasiyetle 0,0125 g tartım alınıp metanolde çözüldü ve yine metanol ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) yöntemiyle antioksidan aktivite tayini Apak ve arkadaşlarının (Apak ve ark., 2004) geliştirdiği yöntemle göre belirlenmiştir. Kapaklı 15 mL'lik falkon tüplerinin içine bakır (II) çözeltisi, neokuproin

çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine (x) mL örnek çözeltisi (veya standart madde) ve (1-x) mL H₂O ilave edildi. Toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler vorteks ile iyice karıştırıldı. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 200 rpm'de çalkalandı. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı JASCO V-650 UV/VIS spektrofotometre cihazı kullanılarak 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

Referans Çözelti: 1 mL Cu(II) +1 mL Nc+1 mL NH₄Ac +1,1 mL H₂O

Örnek Çözelti: 1 mL Cu(II)+1 mL Nc+1 mL NH₄Ac +x mL antioksidan+(1,1-x) mL H₂O

CUPRAC yönteminde standart olarak metanolde hazırlanmış $1,0 \times 10^{-3}$ M troloks'un farklı hacimleri alınarak işlemler yapıldığı için, seyrelme etkisi ile elde edilen son konsantrasyonları Denklem 3.2'ye göre hesaplandı. Tablo 3.3'de verilen son konsantrasyonların absorbans farklarına karşı grafiğe geçirilmesiyle doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edildi.

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \quad (3.2)$$

Burada;

M₁:Troloksun başlangıç konsantrasyonu

V₁:Alınan Troloks hacmi

M₂: Troloksun son konsantrasyonu

V₂: CUPRAC yönteminin toplam hacmi (4,1 mL)

Tablo 3.3: Troloksun (TR) hacim-konsantrasyon değerleri

Alınan Hacim (μ L)	Son Konsantrasyon (M)
50	$1,22 \times 10^{-5}$
100	$2,44 \times 10^{-5}$
150	$3,66 \times 10^{-5}$
200	$4,88 \times 10^{-5}$
250	$6,10 \times 10^{-5}$

SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1)'den elde edilen bitki ekstraktları ayrı ayrı CUPRAC yöntemi uygulandı, denemeler 3'er kez tekrarlandı ve toplam antioksidan kapasiteleri (TAC) mmol troloks eşdeğeri (TE)/kg kuru bitki cinsinden Denklem 3.3'e (Tufan, 2012) göre belirlendi.

$$TAC_{\text{mmol/kg}} = \frac{\text{Absorbans} \pm \text{kayım}}{\epsilon_{\text{troloks}}} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Alınan örnek hacmi}} \times \frac{\text{Toplam ekstre hacmi (mL)}}{\text{Bitki miktarı (g)}} \times 10^3 \quad (3.3)$$

3.6.2. QUENCHER-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

QUENCHER-CUPRAC prosedürü, Tufan ve arkadaşları tarafından (Tufan ve ark., 2013) açıklanan yöntemle yapıldı. Tanecik boyutu 125 μ m'den küçük bitki numunelerinden plastik kapaklı 15 mL falkon tüpünün içine 1 μ g hassasiyetle 10 mg tartılarak alındı. Daha sonra üzerine etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde hazırlanan toplam hacmi 4,1 mL olacak şekilde CUPRAC reaktif çözeltisi (sırasıyla bakır (II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL ve 1,1mL etanol:su (1:1, v/v)) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon karışımı 1 dakika süresince vortekslendikten sonra bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlıkta ve oda sıcaklığında 40 dakika boyunca 200 rpm'de çalkalamaya devam edildi. Reaksiyon

sonunda karışım 4 dakika boyunca 4500 rpm’de santrifüjlendi ve elde edilen berrak çözelti spektrofotometrik ölçüm öncesi 0,45 µm (AFG Scientific MCE-45/25) şırınga filtre ile süzüldü. Absorbans değerleri JASCO V-650 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak 450 nm’de ölçüldü. Her bir örnek üç defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır.

Absorbans değerleri elde edilen kalibrasyon doğrusunu oluşturan aralığın dışına çıktığı durumlarda CUPRAC reaktif çözeltisine inert olan selülozla seyreltilmiştir (Tufan ve ark., 2013). Bu amaçla havada kurutulmuş toz halinde olan 125µm’den küçük ARH ve Absorbans değerlerinin, elde edilen kalibrasyon doğrusu aralığının dışına çıktığı durumlarda, CUPRAC reaktif çözeltisi inert olan selülozla seyreltilmiştir (Tufan ve ark., 2013). Bu amaçla, havada kurutulmuş parça boyutu 125µm’den küçük ARH ve CFH örnekleri toz haldeki selülozla ağırlıkça 1:10, EVH örnekleri 1:40, LTH örnekleri 1:20, CPH örnekleri 1:80 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir. Liyofilizatör ile kurutulmuş parçacık boyutu 125 µm’den küçük ARL, CFL örnekleri toz haldeki selülozla ağırlıkça 1:10, EVL örnekleri 1:80, LTH örnekleri 1:20, CPL örnekleri 1:40 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir. Toplam antioksidan kapasite (TAC) Denklem 3.4’de (Tufan, 2012) görüldüğü gibi mmol TE/kg cinsinden hesaplandı.

$$TAC_{mmol/kg} = \frac{Absorbans \pm kayım}{\epsilon_{Troloks}} \times \frac{Toplam\ hacim}{Alınan\ örnek\ hacmi} \times 10^3 \quad (3.4)$$

3.6.3. ABTS/TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

ABTS^{•+} stok çözeltisi: 0,1 mg hassasiyetle 0,0960 g ABTS tartılarak deiyonize su ile çözüldü ve hacmi 25 mL’ye tamamlanarak 7 mM çözelti olarak hazırlandı. Bu çözelti

içine son konsantrasyonu 2,45 mM olacak şekilde 0,1 mg hassasiyetle 0,0166 g $K_2S_2O_8$ (potasyum persülfat) tartılarak ilave edildi. Elde edilen ABTS stok çözeltisi oda sıcaklığında ve karanlıkta, 12-16 saat bekletilmek suretiyle hazırlandı (Re ve ark., 1999).

ABTS^{•+} çalışma çözeltisi: ABTS^{•+} stok çözeltisinin etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü ile 734 nm'de 0,750-0,800 absorbans aralığına kadar seyreltilmesi ile günlük olarak taze hazırlanmıştır (Sermen ve ark., 2012a; Serpen ve ark., 2012b). 10 mL ABTS^{•+} stok çözeltisinden yaklaşık 800 ml ABTS^{•+} çalışma çözeltisi elde edildi.

ABTS^{•+} yöntemiyle antioksidan aktivite tayininde sonuçlar, troloks standardının metanolde hazırlanmış 0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2; 2,4 mM (radikal reaksiyon çözeltisindeki troloks derişimi 0; 4; 8; 12; 16; 20; 24 μ M olacak şekilde) konsantrasyonlarının absorbans farklarına karşı elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, mmol troloks eşdeğeri/kg cinsinden toplam antioksidan kapasite olarak verilmiştir. Kapaklı 15 mL'lik falkon tüplerinin içine her bir troloks standart çözeltisinden 0,1 mL alınıp üzerlerine 9,90 mL ABTS^{•+} çalışma çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon çözeltisindeki troloks derişimi 0; 4; 8; 12; 16; 20; 24 μ M olacak şekilde ayarlandı. Kontrol için kapaklı 15 mL'lik falkon tüplerinin içine 0,1 mL etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü, üzerine 9,90 mL ABTS^{•+} çalışma çözeltisinden ilave edildi ve tüm tüpler 1 dakika süresince vortekslendikten sonra bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 200 rpm'de çalkalanarak 30. dakika sonunda JASCO V-650 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak 734 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Troloks standardının farklı konsantrasyonları üç defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır.

SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1)'den elde edilen ekstraktlar, Serpen ve arkadaşlarının (2012a; 2012b) metodunda küçük değişiklikler yapılarak ABTS^{•+} serbest radikal giderme antioksidan aktivite değerleri yönünden incelendiler. İşlemler

yukarıda açıklanan prosedürde troloks standart çözeltisi yerine numune ekstraktları kullanılarak aynı şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerlerinin ortalamasından körlerin ortalaması çıkarıldı. Bu değerden % İnhibisyon_{troloks} Denklem 3.5 ve % İnhibisyon_{örnek} Denklem 3.6 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Radikal süpürme}_{\text{troloks}} = [(\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{troloks}}) / \text{Abs}_{\text{kontrol}}] \times 100. \quad (3.5)$$

$$\% \text{ Radikal süpürme}_{\text{örnek}} = [(\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}) / \text{Abs}_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.6)$$

3.6.4. QUENCHER-ABTS/TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

QUENCHER-ABTS prosedürü ile antioksidan aktivite ölçümü Serpen ve arkadaşları (Serpen ve ark., 2012a; Serpen ve ark., 2012b) tarafından açıklandığı gibi ABTS^{•+} radikal çözeltisi kullanılarak direkt katı-sıvı yüzey etkileşimi esasına göre yapıldı. 125µm'den küçük parçacık boyutlu bitki örneğinden 1 µg hassasiyetle tartılan 10 mg'lık bir kısım plastik kapaklı 15 mL'lik bir falkon tüpünün içerisine konuldu. Reaksiyon, etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde hazırlanan ABTS^{•+} çalışma çözeltisinden 10 mL ilave edilerek 1 dakika süresince vortekslenmek suretiyle başlatıldı. Daha sonra bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 27 dakika boyunca 200 rpm'de çalkalandı. Reaksiyon sonunda karışım 2 dakika boyunca 4500 rpm'de santrifüjlendi ve elde edilen berrak çözeltilerin absorbanları 734 nm'de, 30 dakikalık reaksiyon süresinin bitiminde 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip (AFG Scientific MCE-45/25) şırınga filtreden yapılan süzme işleminden sonra JASCO V-650 UV/VIS spektrometre cihazında ölçüldü. QUENCHER-ABTS yöntemiyle toplam antioksidan aktivite tayininde sonuçlar, troloks ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, mmol troloks eşdeğeri (TE)/kg cinsinden verilmiştir.

Absorbans değerlerinin elde edilen kalibrasyon doğrusu aralığının dışına çıktığı durumlarda ABTS•⁺ reaktif çözeltisine inert olan selülozla seyreltilmiştir (Serpren ve ark., 2012a; Serpren ve ark., 2012b). Bu amaçla havada kurutulmuş 125µm'den küçük parça bklğne sahip ARH, EVH, LTH, CFH rnekleri toz haldeki selülozla ağırlıkça 1:10, CPH rnekleri 1:40 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir. Liyofilizatör ile kurutulmuş 125 µm'den küçük parçacık boyutlu ARH, EVH, LTH, CFH rnekleri toz haldeki selülozla ağırlıkça 1:10, CPL rnekleri 1:40 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir.

3.6.5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

DPPH• stok çözeltisi: 0,1 µg hassasiyetle 40 mg DPPH• amber renkli bir dereceli balona alınarak üzerine 100 mL etanol eklenip kapağı sıkıca kapatıldı ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 saat manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra yine karanlık ortamda 1 saat ultrasonik banyoda karıştırıldıktan sonra üzerine 100 mL saf su ilave edildi. Böylelikle etanol:su (1:1, v/v) zcsnde 0,5 mM 200 mL DPPH stok çözeltisi hazırlanmış oldu (Brand-Williams ve ark., 1995).

DPPH• alışma çözeltisi: 0,5 mM 200 mL DPPH stok çözeltisinin yaklaşık 800 mL etanol:su (1:1, v/v) karışımı ile 525 nm'de 0,750-0,800 absorbans aralığına kadar seyreltilmesi ile 0,1 mM DPPH alışma çözeltisi günlük olarak hazırlanmıştır (Brand-Williams ve ark., 1995).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemiyle antioksidan aktivite tayininde sonuçlar, troloks standardının metanolde hazırlanmış 0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2; 2,4 mM'lık konsantrasyonlarının (radikal reaksiyon çözeltisindeki troloks derişimi 0; 4; 8; 12; 16; 20; 24 µM olacak şekilde) absorbans farklarına karşı çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, mmol TE/kg cinsinden toplam antioksidan kapasite olarak verilmiştir.

Kapaklı 15 mL'lik falkon tüpü içine her bir troloks standart çözeltisinden 0,1 mL alınıp üzerlerine 9,90 mL DPPH• çalışma çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon çözeltisindeki troloks derişimi 0; 4; 8; 12; 16; 20; 24 μ M olacak şekilde ayarlandı. Kontrol çözeltisi için 0,1 mL etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü üzerine 9,90 mL DPPH• çalışma çözeltisinden ilave edildi. Troloksun farklı konsantrasyonundaki çözeltileri ve kontrol tüpleri 1 dakika süresince vortekslendi. Daha sonra tüpler bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 200 rpm'de çalkalandılar. 30 dakika sonunda JASCO V-650 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak 525 nm'de absorbens değerleri ölçüldü. Troloks standardının farklı konsantrasyonları ve kontrol üç defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır.

SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1)'den elde edilen ekstraktlar, Brand-Williams ve arkadaşlarının metodunda küçük değışiklikler yapılarak DPPH serbest radikal giderme antioksidan aktivite değerleri yönünden incelendiler. Kapaklı 15 mL'lik falkon tüpünün içine 0,1 mL bitki ekstraktı alınarak üzerine 9,90 mL DPPH• çalışma çözeltisinden ilave edildi, kontrol için 0,1 mL E:S (1:1, v/v) çözücüsü üzerine 9,90 mL DPPH• çalışma çözeltisinden ilave edildikten sonra tüpler 1 dakika süresince vortekslendi. Daha sonra tüpler bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 200 rpm'de çalkalanarak 30 dakika sonunda JASCO V-650 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak 525 nm'de absorbens değerleri ölçüldü. Her bir örnek üç defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır (Brand-Williams ve ark., 1995). Elde edilen absorbensların değerlerinin ortalamasından körlerin ortalaması çıkarıldı. Bu değerden % radikal süpürme_{troloks} denklem 3.5 ve % radikal süpürme_{örnek} denklem 3.6 kullanılarak hesaplandı.

SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1)'den elde edilen ekstraktlar, Brand-Williams ve arkadaşlarının (1995) metodunda küçük değışiklikler yapılarak DPPH serbest radikal giderme antioksidan aktivite değerleri yönünden incelendiler. Her bir işlem, troloks standardı yerine bitki ekstraktları kullanılarak yukarıda açıklandığı şekilde yapıldı. Her bir örnek üç defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır

Elde edilen absorbansların değerlerinin ortalamasından körlerin ortalaması çıkarıldı. Bu değerden % radikal süpürme_{troloks} Denklem 3.5 ve % radikal süpürme_{örnek} Denklem 3.6 kullanılarak hesaplandı.

3.6.6. QUENCHER-DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

QUENCHER-DPPH prosedürü ile antioksidan aktivite ölçümü Serpen ve arkadaşları (2012a; 2012b) tarafından açıklandığı gibi DPPH radikal çözeltisi kullanılarak direkt katı-sıvı yüzey etkileşimi esasına göre yapıldı. Tanecik boyutu 125µm'den küçük bitki örneklerinden plastik kapaklı 15 mL'lik bir falkon tüpünün içerisine 1 µg hassasiyetle 10 mg tartıldı. Reaksiyon çözücüsünde (etanol:su (1:1, v/v)) hazırlanan 0,1 mM DPPH çalışma çözeltisinden 10 mL ilave edildi ve kontrol için kapaklı boş bir 15 mL falkon tüpünün içine 10 mL DPPH çalışma çözeltisinden ilave edildi. Troloks satandardı içeren tüm tüpler ve kontrol tüpleri 1 dakika süresince şiddetli bir şekilde vortekslendi. Daha sonra bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 47 dakika boyunca 200 rpm'de çalkalandı. Reaksiyon sonunda karışım 2 dakika boyunca 4500 rpm'de santrifüjlendi ve elde edilen berrak çözeltiler 50 dakikalık reaksiyon süresinin bitiminde 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip şırınga filtre (AFG Scientific MCE-45/25) ile süzildükten sonra absorbansları 525 nm'de JASCO V-650 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak ölçüldü. QUENCHER-DPPH yöntemiyle toplam antioksidan aktivite tayininde sonuçlar, troloks ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, mmol TE/kg cinsinden verilmiştir.

Absorbans değerlerinin elde edilen kalibrasyon doğrusu aralığının dışına çıktığı durumlarda DPPH reaktif çözeltisine inert olan selülozla seyreltme işlemi uygulanmıştır (Serpen ve ark., 2012a; Serpen ve ark., 2012b). Bu amaçla havada kurutulmuş 125 µm'den küçük parçacık boyutuna sahip ARH, EVH, LTH, CFH örnekleri toz haldeki selülozla ağırlıkça 1:10, CPH örnekleri 1:40 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir.

Liyofilizatör ile kurutulmuş 125µm'den küçük parçacık boyutuna sahip ARH, EVH, LTH, CFH örnekleri toz haldeki selülozla ağırlıkça 1:10, CPL örnekleri 1:40 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir.

3.6.7. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

300 mM 1 L Asetat tamponu (pH=3,6) (I) (% 50 etanolü): 16 mL buzlu asetik asit ve 3,1 g sodyum asetat trihidrat ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) tartılıp 1 L' lik cam balona alınarak etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde çözüldü. Çözeltinin pH'sı kontrol edildi, gerektiğinde uygun asit ya da baz ile 3,6 ya ayarlandı ve hacmi 1 L' ye tamamlandı.

25 mL 40 mM HCl: 82 µL derişik (%37'lik) HCl etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü ile 25 mL'ye tamamlandı.

15 mL 10 mM TPTZ (II): 0,0468 g TPTZ tartılarak 15 mL 40 mM etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde çözüldü.

15 mL 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (III): 0,0811 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ tartılarak 15 mL etanol:su su (1:1, v/v) çözücüsünde çözüldü.

Etanolik FRAP reaktifi: I, II ve III çözeltileri sırasıyla; 10:1:1 oranında karıştırılır. FRAP reaktifi günlük olarak taze hazırlandı (Benzie ve Strain, 1996; Benzie ve Strain, 1999).

FRAP yöntemiyle antioksidan aktivite tayininde sonuçlar, troloks standardının etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde hazırlanmış 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2; 2,4 mM'lık konsantrasyonlarının (radikal reaksiyon çözeltisindeki troloks derişimi 4; 8; 12; 16; 20; 24 µM olacak şekilde) absorbans farklarına karşı elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, mmol troloks eşdeğeri/kg cinsinden toplam antioksidan kapasite olarak verilmiştir. Kapaklı 15 mL'lik falkon tüplerinin içine her bir troloks standart çözeltisinden 0,1 mL alınıp üzerlerine 9,90 mL taze hazırlanmış FRAP reaktifi çözeltisinden ilave edilerek reaksiyon çözeltisindeki troloks derişimi 4; 8; 12; 16; 20; 24 µM olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Numune körü tüplerine 0,1 mL troloks standardı alınarak üzerine 9,90 mL etanol:su (1:1, v/v) FRAP çözücüsü

eklendi; reaktif körü tüplerine 0,1 mL etanol:su FRAP çözücüsü alınarak üzerine 9,90 mL FRAP reaktifi çözeltisinden eklendi. Numune körü tüpleri dışındaki tüm tüplere 30 saniye aralıklarla tek tek 9,90 mL FRAP reaktifi eklenerek, reaksiyon karışımı 1 dakika süresince vortekslendikten sonra reaksiyon başlatılmıştır. Daha sonra bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 200 rpm’de çalkalandılar. 40’ıncı dakikası dolan tüpteki çözeltinin JASCO V-650 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak 593 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Her bir troloks standardı üç defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır (Benzie ve Strain, 1996; Benzie ve Strain, 1999).

SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1)’den elde edilen ekstraktlar, Benzie ve Strain tarafından geliştirilen metotta küçük değişiklikler yapılarak FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) yöntemiyle antioksidan aktivite tayini yönünden incelendiler. Kapaklı 15 mL’lik falkon tüpünün içine 0,1 mL bitki ekstraktı alınarak üzerine 9,90 mL taze hazırlanmış FRAP reaktifi çözeltisi ilave edildikten sonraki tüm aşamalar troloks standardında olduğu gibi uygulandı. Her bir örnek üç defa analiz edilmiş ve ortalama değerler kullanılmıştır (Benzie ve Strain, 1996; Benzie ve Strain, 1999).

3.6.8. QUENCHER-FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

QUENCHER-FRAP prosedürü ile antioksidan aktivite ölçümü Serpen ve arkadaşlarının (2012a; 2012b) yöntemine göre yapıldı. Bu deneylerde taze hazırlanmış FRAP reaktifi çözeltisi kullanılarak direkt katı-sıvı yüzey etkileşimi esas alındı. Tanecik boyutu 125µm’den küçük her bir bitki örneğinden plastik kapaklı 15 mL’lik falkon tüpünün içerisine 1 µg hassasiyetle 10 mg tartıldı. Reaksiyon, çözücüsünde (etanol:su (1:1, v/v)) taze hazırlanmış FRAP reaktifi çözeltisinden 30 saniye aralıklarla tek tek 10 mL ilave edilerek 1 dakika süresince vortekslenerek başlatıldı. Daha sonra bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 37 dakika boyunca

200 rpm’de çalkalandı. Reaksiyon sonunda karışım 2 dakika boyunca 4500 rpm’de santrifüjlendi ve elde edilen berrak çözeltinin absorbansı, 30 dakikalık reaksiyon süresinin bitiminde 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip bir şırınga filtre (AFG Scientific MCE-45/25) ile süzöldükten sonra JASCO V-650 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak 593 nm’de ölçüldü. QUENCHER-FRAP yöntemiyle toplam antioksidan aktivite tayininde sonuçlar, troloks ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, mmol TE/kg cinsinden hesaplandı.

Absorbans değerlerinin elde edilen kalibrasyon doğrusu aralığının dışına çıktığı durumlarda FRAP reaktif çözeltisine inert olan selülozla seyreltme işlemi uygulanmıştır (Serpın ve ark., 2012a; Serpın ve ark., 2012b). Bu amaçla havada kurutulmuş 125µm’dan küçük parçacık boyutuna sahip ARH, EVH, LTH, CFH örnekleri toz haldeki selülozla ağırlıkça 1:10, CPH örnekleri ise 1:40 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir. Liyofilizatör ile kurutulmuş 125 µm’dan küçük parçacık boyutuna sahip ARH, EVH, LTH, CFH örnekleri toz haldeki selülozla ağırlıkça 1:10, CPH örnekleri 1:40 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir.

3.7. Sıvı Kromatografi Kütle/Kütle Spektrometre Sistemi (LC MS/MS) Cihazı Özellikleri ve Kromatografik Şartlar

SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1)’den elde edilen ekstraktlarının kalitatif ve kantitatif analizleri SEM firması İstanbul Ar-Ge laboratuvarında Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC-MS/MS cihazında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sıvı kromatografi sistemi: Agilent 1290 Infinity model degazer, Agilent 1290 Infinity model oto örnekleyici, Agilent 1290 Infinity Binary model pompa, Agilent 1290 Infinity model termostatl kolon fırını ve Agilent Ultivo Triple Quadrupole kütle spektrometre birleşiminden oluşmaktadır. Tüm analizler için bir PerkinElmer Brownlee Hres DB C18 kolon (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.9 µm partikül) kullanıldı. Kolon fırın sıcaklığı 30°C’ye ayarlanmıştır. Elüsyon gradiyentinde hareketli A fazında 10 mM amonyum format ve %

0,1 formik asit içeren ultra saf su çözeltisi ve hareketli B fazında % 0,1 formik asit içeren asetonitril çözeltisi kullanılmıştır. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı. Analitlerin en uygun şekilde ayrımının gerçekleşmesi için UHPLC gradiyent koşulları % 2 B (0-3. dakika.), % 2-20 B (3-3,1. dakika), % 20 B (3,1-5. dakika), % 20-2 B (5-5,1. dakika), % 2 B (5,1-10. dakika) olarak ayarlandı. Enjeksiyon hacmi 10 µL ve akış hızı 0,3 mL/dakika olarak ayarlandı.

Agilent Ultivo üçlü kuadropol kütle spektrometresi (MS) iyonlaştırma için hem pozitif hem de negatif modda olacak şekilde ayarlanmış bir AJS-ESI (Agilent Jet Stream Electrospray Ionization) kaynağı kullanmaktadır. Yapılan LC-MS/MS analizlerinde veriler sistem bilgisayarına yüklenmiş olan Agilent MassHunter yazılımı ile toplanarak değerlendirmeleri yapılmıştır. Örneklerin miktar analizleri için çoklu reaksiyon takip işlemi (Multiple Reaction Monitoring, MRM) tarama türünde çalıştırılmış, moleküler iyonlar (precursor ions) bir veya iki parçalanma ürünü olarak (product ions) kullanılmış bunlardan birincisi kantitatif analiz, ikincisi ise kalitatif analiz amaçlı olarak elde edilmiştir. Kütle spektrometresinde kullanılan AJS ESI iyon kaynağı parametreleri; gaz sıcaklığı 300°C, nebulizer gaz (N₂) akışı 10 L/dakika, nebulizer basıncı 50 (psi), kılıf gaz sıcaklığı 400°C, kılıf gaz (N₂) akışı 12 L/dakika, kapiller voltajı pozitif +2500 V ve negatif – 2500 V olarak belirlendi.

3.8. GC-MS ile Yağ Asidi İçeriğinin Belirlenmesi

3.8.1. Yağ Ekstraksiyonu ve Yağ Asitlerinin Türevlendirilmesi

Serin, kuru havada ve liyofilizatörde kurutulan numunelerin tanecik boyutu 125 µm'den küçük parçacık boyutuna sahip kısımları üzerinde, Hara ve Radin (1978)'in metodunda değişiklikler yapılarak yağ ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için 2 gram bitki örneği 50 mL'lik falkon tüpüne alınarak üzerine 10 mL hekzan/izopropanol (3:2) ilave edildi ve bir orbital çalkalayıcıda 200 rpm'de 1 saat boyunca çalkalandı. Ardından 4500

rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte toplanan sıvı kısım mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek ayrı bir 50 mL’lik falkon tüpüne aktarıldı.

Yağların metil esterlerinin eldesi oldukça etkili ve pratik bir yöntem olan Christie (1990)’nin metodunda bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Üzerine % 2 sülfirik asit içeren metanolden 5 mL ilave edilerek vorteks ile şiddetli bir şekilde 2 dakika çalkalandı. Daha sonra bu karışım 50°C’ye ayarlanmış etüvde 15 saat boyunca metillendirme işlemi için bekletildi. Bu süre sonunda etüvde bekleyen tüpler oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve üzerine 5 mL % 5’lik NaCl ilave edilerek tekrar vorteks ile 2 dakika süresince şiddetli bir şekilde çalkalandı. Bu işlemlerin sonunda elde edilen yağ asitlerinin metil esterleri (YAME), 5 mL n-hekzan ilave edilerek 5 dakika süreyle vortekste çalkalanmak suretiyle ekstrakte edildi ve faz ayrımı olana kadar bekletildi. Üste toplanan n-hekzan fazı pastör pipeti yardımı ile 15 mL’lik temiz bir tüpe alınarak üzerine 5 mL % 2’lik Na₂CO₃ ilave edildi ve vorteks ile 2 dakika süresince şiddetli bir şekilde çalkalandı. Faz ayrımı olana kadar bekletildi ve yağ asitlerinin metil esterlerini içeren üst faz pastör pipeti yardımı ile 15 mL’lik temiz tüpe alınarak çözücüsü 40°C’de azot altında tamamen uçuruldu. 15 mL’lik deney tüpünde kalan yağ asitlerinin metil esterleri 1,5 mL n-hekzan ile çözülerek enjektör filtreden (Whatman, 13 mm, 0,2 µm, PVDF-Clifton, NJ, USA) viallere süzerek kapakları sıkıca kapatıldı ve zaman geçirilmeden GC-MS analizleri gerçekleştirildi.

3.8.2. Yağ Asidi İçeriklerinin Belirlenmesi İçin GC-MS Koşulları

Bitki örneklerindeki yağ asidi içeriğinin analizi Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezinde FID ve MS dedektörlerle tümleşik bir gaz koromatoğrafi cihazı (GC-FID/MS, Agilent 7890A GC/5975C MS Series-Santa Clara, CA, USA) kullanılarak yapıldı. Analiz SGE Analitik BPX90 (100m x 0.25 mm x 0.25 µm flim, Australia) kolonu kullanarak gerçekleştirildi. Elde edilen YAME’ler otomatik örnekleyicili enjeksiyon sistemi kullanılarak 1,0 µL hacmindeki miktar

splitless modda çalıştırılan cihaza enjekte edildi ve enjeksiyon sıcaklığı 250 °C ve MS dedektör sıcaklığı 250 °C olarak ayarlandı. Taşıyıcı gaz helyum 1 mL/dakika akış hızıyla kullanıldı. Fırın sıcaklığı başlangıçta 120 °C 0. dakikadan 5 °C/dakika artış ile 250 °C'ye kadar ısıtıldıktan sonra 14 dakika bu sıcaklıkta bekleyecek şekilde programlandı. Toplam koşma zamanı 50 dakika ve dedektörün gecikme süresi 12 dakika'ya ayarlandı. H₂ akışı 35 mL/dakika, kuru hava akışı 350 mL/dakika, dedektör make up gazı olarak N₂ akışı 20 mL/dakika olarak programdan ayarlandı. GC-FID ve MS sonuçları eşzamanlı olarak kaydedildi. Standart yağ asitleri ile metodun kalibrasyonu yapılmış ve bitkilerde bulunan yağ asitleri tespit edilmiş ve ayrıca bileşiklerin tanımlanması kütle spektrumları cihazında kayıtlı NIST ve WHILEY kütüphaneleri ile karşılaştırılarak yapıldı.

3.9. ICP-MS ile Metal İçerik Analizi

3.9.1. ICP-MS ile Metal İçerik Analizi İçin Örnek Hazırlanması

Bitki örneklerinin ağır metal analizi için serin-kuru hava ve liyofilizatörde kurutulan, tanecik boyutu 125 µm'den küçük olan örneklerden yaklaşık 0,5 gram tartılıp teflon tüplerin içine konuldu. Asitle çözündürme işlemi için 10 mL derişik nitrik asit eklendi ve boş bir teflon tüpe kör hazırlamak için sadece 10 mL HNO₃ konuldu. Teflon kapların kapağı sıkıca kapatılarak CEM marka MARS6 ONE TOUCH (USA) model mikrodalga parçalayıcı fırınına yerleştirildi. 15 dakika içinde maksimum sıcaklık 210 °C'ye kadar yükseltilerek bu sıcaklıkta 15 dakika bekletildi. Toplamda 30 dakika kapalı sistemde bekletilerek çözündürme işlemi gerçekleştirildi. Mikrodalga fırın sistemi soğuduktan sonra teflon tüplerde bulunan örnekler ultra saf su ile iyice yıkanarak 25 mL plastik balonlara aktarıldı. Hacimleri tamamlandı ve kapakları sıkıca kapatılarak analiz için +4°C'de muhafaza edildi.

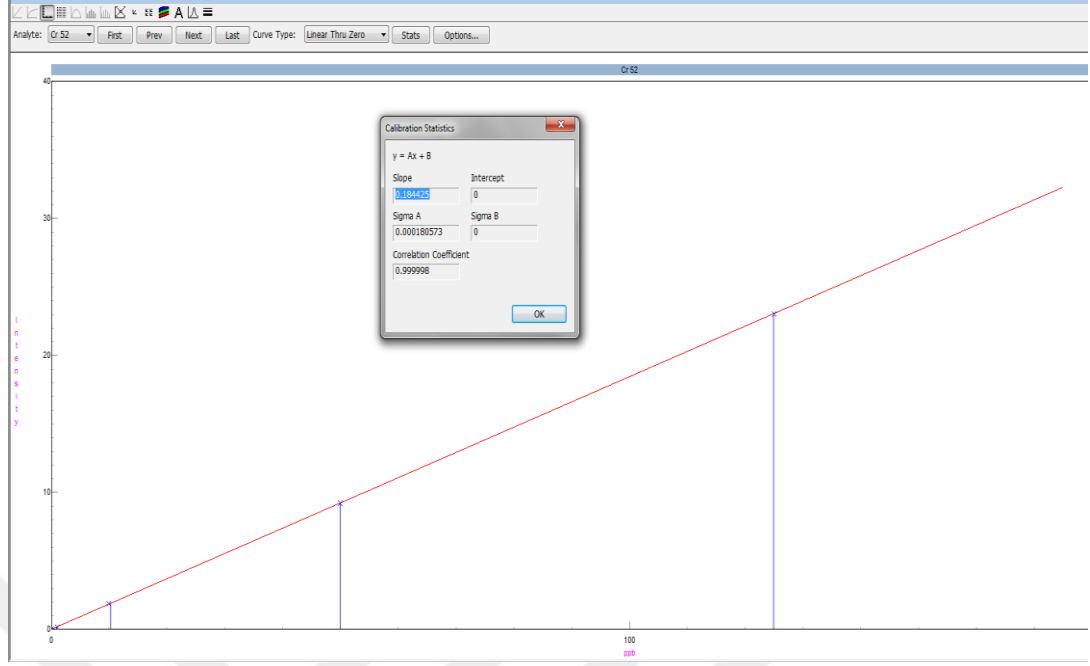
3.9.2. Metal İçerik Analizi için ICP-MS Koşulları

Mikrodalga fırınında hazırlanan bitki numunelerinin metal içerik analizleri Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezinde NexION® 2000 (PerkinElmer® Inc., USA) marka RF power 1300W model bir ICP-MS cihazında alındı. Cam nebulizer gazlaştırıcı (MEINHARD® plus Glass Type C), cam siklonik sprey hazne (sisleştirme odası), nikel konlar ve entegre bir auto-sampler bulunduran cihazda, plazma gaz akışı 15 mL/dakika, yardımcı gaz akışı 1,2 mL/dakika, nebulizer gaz akışı 1,15 mL/dakika idi. Human power I cihazından elde edilen 18,3 MΩ.cm ultra saf su kullanılarak % 1 nitrik asit-ultra saf su içeren yıkama çözeltisi hazırlandı. ICP-MS analiz metodunda, numune seyreltmeleri ve yıkama işlemlerinin tümünde bu çözelti kullanıldı.

ICP-MS kalibrasyon çözeltileri ticari olarak satılan 10 µg/mL konsantrasyonda multi-element standartları kullanılarak hazırlandı. % 1'lik nitrik asit-ultra saf su ile seyreltilip metal analizi için hazırlanan uygun konsantrasyonlar ve iç standartlar Tablo 3.4'te gösterilmiştir. Örnek olarak Cr metalinin ICP-MS ile kalibrasyon grafiği Şekil 3.1'de gösterilmiş ve diğer metallerin kalibrasyon grafikleri Ek Şekil 6-18'de gösterilmiştir. Analizlerde ayarlama, veri toplama ve veri analizi dahil olmak üzere cihazı kontrol etmek için Syngistix for ICP-MS software version 2.2 cihaz yazılımı kullanılmıştır.

Tablo 3.4: ICP analizinde kullanılan metallerin konsantrasyon aralığı ve iç standartlar.

Analitler	Konsantrasyon aralığı (ppb)	Internal standart
⁵¹ V, ⁵⁵ Mn, ⁵⁷ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁸² Se	0,1- 1-10- 50-125-250-500	⁷⁴ Ge
⁵² Cr, ⁶³ Cu, ¹⁰⁷ Ag, ¹¹¹ Cd	0,1- 1-10- 50-125	⁷⁴ Ge
²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb	0,1- 1-10- 50-125- 250-500	⁸⁹ Y
	0,1- 1-10	²⁰⁹ Bi
	0,1- 1-10- 50	²⁰⁹ Bi



Şekil 3.1: ICP-MS metal analizinde Cr'nin kalibrasyon grafiği.

3.10. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Yapılan çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS-21.0 programı kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız üç paralel gerçekleştirilen ölçüm ortalamalarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi 'tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile incelenmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı incelemek için Post-Hoc çoklu karşılaştırma (Tukey HSD) testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerde % 95 güven aralığında ($p < 0,05$) sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Ekstraksiyonların Verim Yüzdeleri

AR, EV, LT, CF, CP bitkilerinin serin-kuru havada ve liyofilizatörde kurutulmuş numunelerine SE, UDE ve ASE yöntemleriyle uygulanan ekstraksiyon deneylerinin verimi Denklem 4.1'e göre hesaplandı ve aşağıdaki Tablo 4.1'de verildi. Ayrıca, verimleri birbirleri ile karşılaştırabilmek için çizilen sütun grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir.

$$\% \text{ Verim} = (\text{Kuru Ekstrakt miktarı} / \text{Havada Kuru Numune Miktarı}) \times 100 \quad (4.1)$$

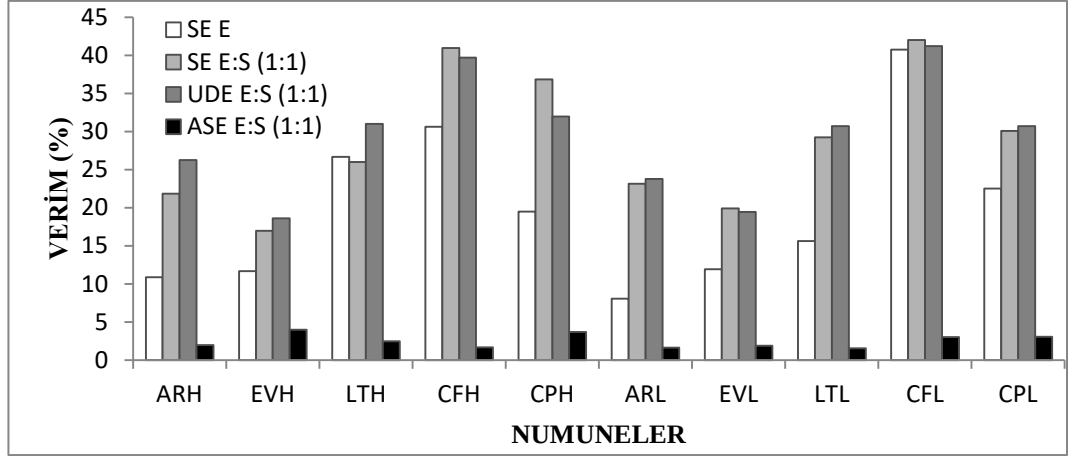
Tablo 4.1: Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

BİTKİLER	Ekstraksiyon Türülerinin % Ekstraksiyon verimi			
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)
ARH	10,91±0,49 ^c	21,85±0,72 ^b	26,26±1,45 ^a	1,99±0,01 ^d
EVH	11,69±0,17 ^b	16,97±1,42 ^a	18,62±0,66 ^a	3,99±0,02 ^c
LTH	26,68±0,28 ^b	26,01±0,25 ^b	30,99±1,34 ^a	2,48±0,02 ^c
CFH	30,63±0,35 ^c	40,98±0,11 ^a	39,69±0,36 ^b	1,71±0,04 ^d
CPH	19,51±0,46 ^c	36,84±0,45 ^a	31,96±1,15 ^b	3,69±0,02 ^d
ARL	8,08±0,16 ^c	23,16±0,30 ^b	23,80±0,24 ^a	1,65±0,01 ^d
EVL	11,96±0,04 ^b	19,91±1,33 ^a	19,47±0,55 ^a	1,90±0,03 ^c
LTL	15,65±0,22 ^b	29,24±0,88 ^a	30,92±0,95 ^a	1,55±0,01 ^c
CFL	40,77±0,30 ^b	42,03±0,25 ^a	41,22±0,54 ^{ab}	3,04±0,02 ^c
CPL	22,53±0,07 ^b	30,09±0,73 ^a	30,73±0,32 ^a	3,09±0,01 ^c

* Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05).

SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş, LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş, CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.



Şekil 4.1: Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri.

Ekstraksiyon verimlerine bakıldığında, ARH numunesinde UDE E:S(1:1)'de verimin en yüksek olduğu (% 26,26±1,45), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de olduğu (% 1,99±0,01) görülmektedir. ARH numunesine gerçekleştirilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S (1:1), ASE E:S (1:1) ekstraksiyon yöntemlerinin ekstraksiyon verim yüzdeleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

EVH numunesinde UDE E:S(1:1)'de verimin en yüksek olduğu (%18,62±0,66), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de olduğu (% 3,99±0,02) görülmektedir. EVH numunesinde verim yüzdeleri ortalamaları arasında SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) yöntemleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde bulunamadı ($p>0,05$). Ancak SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) verimleri arasında ve SE ile ASE E:S (1:1) verimleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

LTH numunesine bakıldığında, UDE E:S(1:1)'de verimin en yüksek olduğu (% 30,99±1,34), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de elde edildiği (%2,48±0,02) görülmektedir. LTH numunesinde verim yüzdeleri açısından SE E:S (1:1) ve SE E yöntemleri arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Fakat, SE E:S (1:1) ile ASE E:S(1:1) verimleri arasında ve UDE E:S(1:1) ile ASE E:S (1:1) verimleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

CFH numunesinde SE E:S(1:1)'de verimin en yüksek olduğu (% 40,98±0,11), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de elde edildiği (% 1,71±0,04) görülmektedir. CFH numunesine gerçekleştirilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S (1:1), ASE E:S (1:1) ekstraksiyon yöntemlerinin ekstraksiyon verim yüzdeleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$).

CPH numunesinde SE E:S(1:1)'de verimin en yüksek olduğu (%36,84±0,45), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de olduğu (% 3,69±0,02) görülmektedir. CPH numunesine gerçekleştirilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S (1:1), ASE E:S (1:1) ekstraksiyon uygulamalarında ekstraksiyon verim yüzdeleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,05$).

ARL numunesinde UDE E:S (1:1)'de verimin en yüksek olduğu (% 23,80±0,24), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de elde edildiği (%1,65±0,01) görülmektedir. ARL numunesine gerçekleştirilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S (1:1), ASE E:S (1:1) deneylerinden elde edilen ekstraksiyon verim yüzdeleri ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

EVL numunesinde en yüksek verimin (% 19,91±1,33) SE E:S(1:1)'de, en düşük verimin ise ASE E:S (1:1)'de olduğu (% 1,90±0,03) belirlenmiştir. EVL numunesinde ekstraksiyon verim yüzdeleri ortalamaları açısından SE E:S (1:1) ve UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($p>0,05$). SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında ve SE E ile ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında anlamlı bir farklar olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

LTL numunesinde UDE E:S(1:1)'de verim değerinin en yüksek olduğu (% 30,92±0,95), en düşük verimin ise ASE E:S (1:1)'de elde edildiği (%1,55±0,01) belirlenmiştir. LTL numunesinde ekstraksiyon verim yüzdeleri ortalamaları açısından SE E:S (1:1) ve UDE

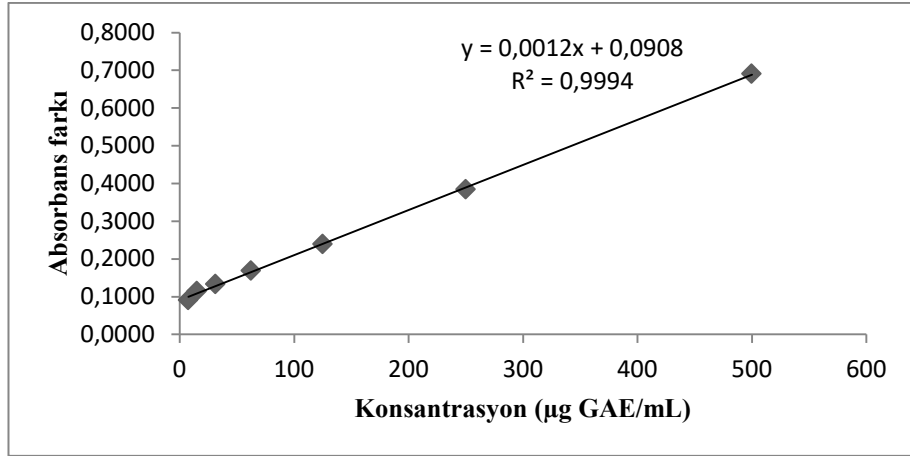
E:S(1:1) yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Ancak SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında ve SE E ile ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında anlamlı farklar olduğu ortaya konmuştur ($p<0,05$).

CFL numunesinde en yüksek verim (% $42,03\pm0,25$) SE E:S(1:1)'de, en düşük verim ise (% $3,04\pm0,02$) ASE E:S (1:1)'de elde edilmiştir. CFL numunesinde ekstraksiyon verim yüzdeleri ortalamaları açısından SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemleri ve SE E ve UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında ve SE E:S (1:1), UDE E:S(1:1) ile ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında anlamlı farklar olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

CPL numunesinde UDE E:S(1:1)'de en yüksek verim elde edilmişken (% $30,73\pm0,32$), en düşük değer ise ASE E:S (1:1)'de (% $3,09\pm0,01$) belirlenmiştir. CPL numunesinde ekstraksiyon verim yüzdeleri ortalamaları açısından SE E:S (1:1) ve UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında istatistiksel olarak arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında ve SE E ile ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında önemli düzeyde fark bulunmuştur ($p<0,05$).

4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

Numunelerin, SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleri ile elde edilen ekstraktlarının Folin-Ciocalteu yöntemine göre toplam fenolik madde içeriklerini belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafiği gallik asitin farklı konsantrasyonları için elde edildi (Şekil 4.2). Kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanan toplam fenolik madde içerik değerleri mg GAE/100 g kuru numune olarak Tablo 4.2'de, karşılaştırma yapmak adına çizilen sütun grafik ise Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.2: Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği ($\lambda=765\text{nm}$).

Tüm ekstraktların toplam fenolik içerikleri standart gallik asit grafiğinden Şekil 4.2. elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi (Denklem 4.2).

$$\text{Absorbans} = 0,001(\mu\text{gGAE/mL}) + 0,090 \quad (R^2=0,999) \quad (4.2)$$

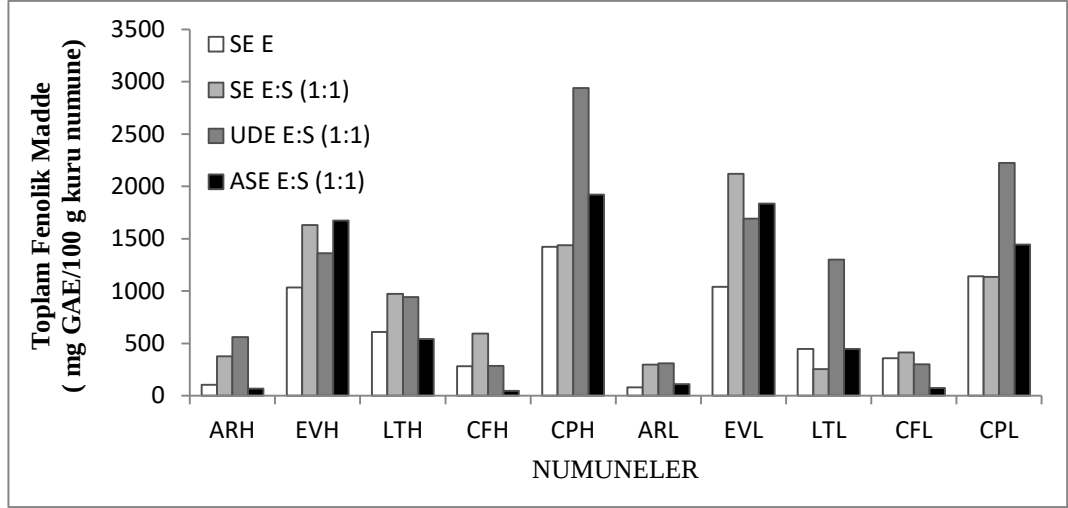
Tablo 4.2: Bitki numunelerinin SE, UDE ve ASE'den elde edilen ekstraktlarının Folin-Ciocalteu yöntemi toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)

Toplam Fenolik Madde (mg GAE/100 g kuru numune)				
BİTKİLER	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)
ARH	104,58±1,38 ^c	375,99±13,65 ^b	559,05±45,46 ^a	67,77±3,29 ^c
EVH	1033,58±8,68 ^c	1630,02±57,49 ^a	1360,37±25,83 ^b	1673,01±6,59 ^a
LTH	607,92±2,36 ^b	972,65±59,98 ^a	941,99±37,18 ^a	540,41±11,61 ^b
CFH	280,50±3,75 ^b	592,79±12,52 ^a	285,74±27,50 ^b	47,10±1,02 ^d
CPH	1423,33±4,69 ^c	1437,19±45,69 ^c	2939,25±37,18 ^a	1920,60±30,58 ^b
ARL	79,67±2,16 ^b	296,19±37,41 ^a	308,69±13,11 ^a	111,21±2,23 ^b
EVL	1039,17±2,55 ^d	2119,40±59,20 ^a	1690,77±41,17 ^c	1834,17±1938 ^b
LTL	447,33±5,92 ^b	254,45±38,24 ^d	768,73±6,40 ^a	349,50±9,32 ^c
CFL	357,58±5,51 ^{ab}	413,31±30,41 ^a	300,15±34,81 ^b	74,04±0,95 ^c
CPL	1140,08±2,65 ^c	1134,97±37,41 ^c	2222,56±6,40 ^a	1444,27±33,15 ^b

* Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş, LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş, CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.



Şekil 4.3: Numunelerin, SE, UDE ve ASE'den elde edilen ekstraktlarının Folin-Ciocalteu yöntemine göre ölçülen toplam fenolik madde içeriklerinin karşılaştırılması.

Toplam fenolik madde içeriklerine bakıldığında, ARH numunesi için toplam fenolik madde miktarı mg GAE/100 g kuru numune cinsinden en yüksek UDE E:S(1:1)'de ($559,05 \pm 45,46$), en düşük olarak da ASE E:S (1:1)'de ($67,77 \pm 3,29$) elde edilmiştir. Toplam fenolik madde ortalamaları açısından SE E ($104,58 \pm 1,38$) ile ASE E:S (1:1) ($67,77 \pm 3,29$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). SE E:S (1:1) ile ASE E:S(1:1) yöntemleri arasında ve UDE E:S(1:1) ile SE E:S (1:1) ($375,99 \pm 13,65$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

EVH numunesinde en yüksek toplam fenolik madde mg GAE/100 g kuru numune olarak ASE E:S (1:1)'de ($1673,01 \pm 6,59$), en düşük miktar ise SE E'de ($1033,58 \pm 8,68$) elde edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarları açısından ASE E:S (1:1) ($1673,01 \pm 6,59$) ile SE E:S (1:1) ($1630,02 \pm 57,49$) yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). ASE E:S(1:1) ile SE E:S (1:1) yöntemleri arasında ve UDE E:S(1:1) ($1360,37 \pm 25,83$) ile SE E ($1033,58 \pm 8,68$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ($p < 0,05$).

LTH numunesinde en yüksek toplam fenolik madde miktarı mg GAE/100 g kuru numune cinsinden SE E:S (1:1)'de ($972,65 \pm 59,98$), en düşük değer ise ASE E:S (1:1)'de elde edildi ($540,41 \pm 11,61$). Uygulanan yöntemlere göre toplam fenolik madde miktarı ortalamaları açısından istatistiksel olarak bir fark olup olmadığına bakıldı. SE E:S (1:1) ($972,65 \pm 59,98$) ile UDE E:S(1:1) ($941,99 \pm 37,18$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p > 0,05$). Ayrıca SE E ($607,92 \pm 2,36$) ile ASE E:S (1:1) ($540,41 \pm 11,61$) yöntemleri arasında da anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi ($p > 0,05$). SE E:S(1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında ve SE E ile ASE E:S (1:1) yöntemleri arasındaki farkların önemli düzeyde olduğu görüldü ($p < 0,05$).

CFH numunesinde toplam fenolik madde miktarı en yüksek SE E:S (1:1)'de ($592,79 \pm 12,52$), en düşük ASE E:S (1:1)'de ($47,10 \pm 1,02$) elde edildi. Bu numune için toplam fenolik madde ortalamaları arasında yöntemler açısından istatistiksel bir fark olup olmadığına bakıldığında, UDE E:S(1:1) ($285,74 \pm 27,50$) ile SE E ($280,50 \pm 3,75$) yöntemlerinden elde edilen sonuçların farklı olmadığı ($p > 0,05$) görülmektedir. UDE E:S(1:1) ile SE E:S (1:1) yöntemlerinden elde edilen sonuçlar arasında ve SE E:S(1:1) ile ASE E:S (1:1) yöntemlerinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu bulundu ($p < 0,05$).

CPH numunesinde toplam fenolik madde en yüksek UDE E:S (1:1)'de ($2939,25 \pm 37,18$), en düşük ise SE E (1:1)'de ($1423,33 \pm 4,69$) belirlenmiştir. CPH numunesinde toplam fenolik madde miktarı ortalamaları arasında yöntemler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı araştırıldı. Buna göre SE E:S(1:1) ($285,74 \pm 27,50$) ile SE E yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). SE E:S(1:1) ile SE E yöntemleri arasında ve UDE E:S(1:1) ile ASE E:S (1:1) ($1920,60 \pm 30,58$) yöntemleri arasında bulunan farklar anlamlıdır ($p < 0,05$).

ARL numunesinde en yüksek toplam fenolik madde UDE E:S (1:1)'de ($308,69 \pm 13,11$) bulundu. En düşük değer ise SE E'de ($79,67 \pm 2,16$) belirlendi. Bu numune için toplam

fenolik madde miktarları açısından UDE E:S ile SE E:S (1:1) ($296,19 \pm 37,41$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$). Ayrıca ASE E:S (1:1) ($111,21 \pm 2,23$) ile SE E yöntemleri arasında da anlamlı bir farkın olmadığı görülmektedir ($p > 0,05$). Fakat, SE E:S(1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemleri arasında ve SE E ile ASE E:S (1:1) yöntemleri arasındaki farkların önemli düzeyde olduğu görüldü ($p < 0,05$).

EVL numunesinde toplam fenolik madde miktarının en yüksek bulunduğu ekstrakt SE E:S(1:1) ($2119,40 \pm 59,20$) iken, en düşük değer ise SE E ekstraktından elde edildi ($1039,17 \pm 2,55$). EVL numunesi için toplam fenolik madde miktarı ortalamaları arasında SE E:S(1:1), ASE E:S(1:1) ($1834,17 \pm 1938$), UDE E:S(1:1) ($1690,77 \pm 41,17$), SE E yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). LTL numunesinde toplam fenolik madde miktarı en yüksek UDE E:S(1:1)'de ($768,73 \pm 6,40$) bulundu. En düşük değeri ise SE E:S(1:1) ($254,45 \pm 38,24$) sergiledi. LTL numunesi için toplam fenolik madde miktarı ortalamaları arasında UDE E:S(1:1), SE E ($447,33 \pm 5,92$), ASE E:S(1:1) ($349,50 \pm 9,32$), SE E:S(1:1) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

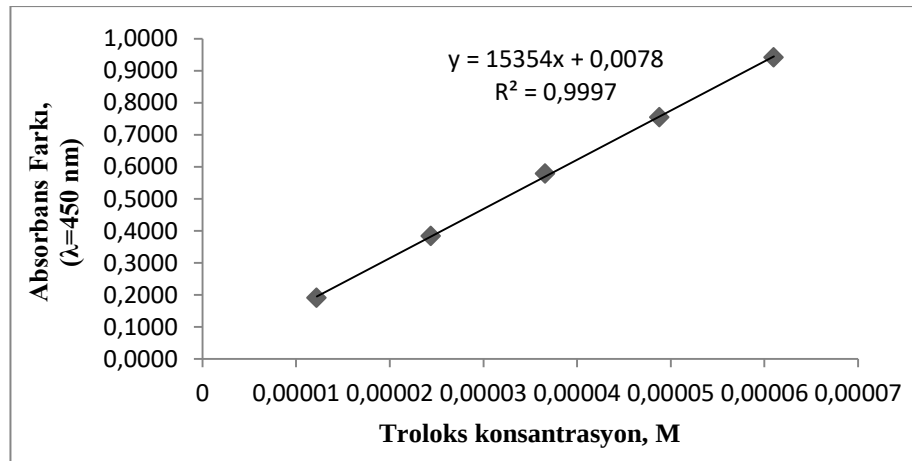
CFL numunesinde toplam fenolik madde miktarı en yüksek bulunan ekstrakt SE E:S (1:1)'den elde edilen ekstrakt idi ($413,31 \pm 30,41$). En düşük değer ise ASE E:S (1:1)'den elde edildi ($74,04 \pm 0,95$). Bu numune için SE E:S (1:1) ile SE E ($357,58 \pm 5,51$) yöntemleri açısından toplam fenolik madde miktarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Benzer şekilde SE E ile UDE E:S(1:1) ($300,15 \pm 34,81$) yöntemleri arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) arasında ve SE E:S (1:1), UDE E:S(1:1) ile ASE E:S (1:1) arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). CPL numunesinde en yüksek toplam fenolik madde miktarının UDE E:S(1:1)'de ($2222,56 \pm 6,40$), en düşük miktarın ise SE E:S (1:1)'de ($1134,97 \pm 37,41$) olduğu görülmektedir. CPL numunesinde SE E ($1140,08 \pm 2,65$) ile SE E:S (1:1) yöntemlerinden elde edilen ortalamalar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). SE E:S (1:1) ile SE E:S(1:1) yöntemleri arasında ve UDE E:S(1:1) ile ASE

E:S (1:1) (1444,27±33,15) yöntemleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

4.3. Antioksidan Tayin Metodlarından Elde Edilen Bulgular

4.3.1. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

Numunelerin, SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleri ile elde edilen ekstraktlara CUPRAC yöntemi ile toplam antioksidan kapasiteleri tayini yapıldı. Troloksun'un metanolde hazırlanmış farklı konsantrasyonlarının absorpsiyonlarına karşı elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.4'te gösterildi. Toplam antioksidan kapasite değerleri, troloksun molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak Denklem 3.3 yardımıyla hesaplandı. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen Denklem 4.3 kullanılarak numunelerin CUPRAC türünden toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4: CUPRAC yönteminde troloks standardı (metanol çözücüsünde) için elde edilen kalibrasyon grafiği (λ=450 nm)

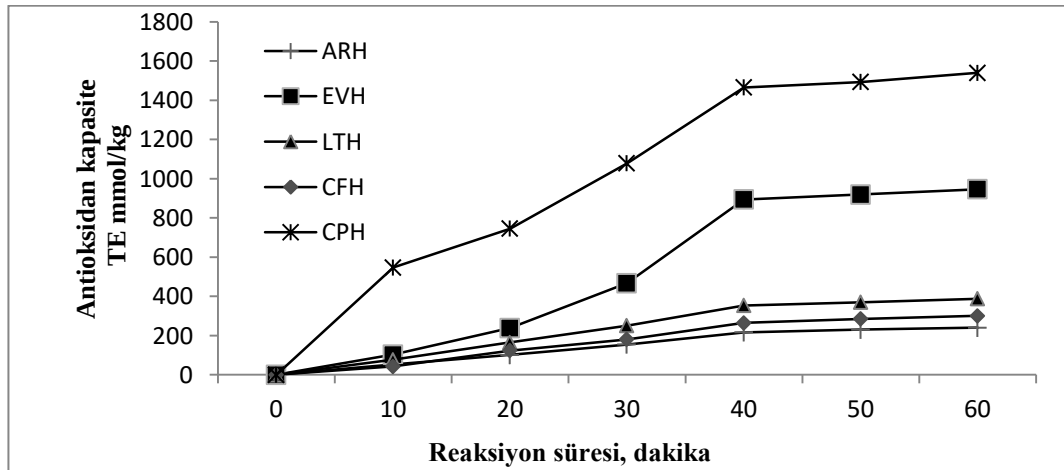
$$\text{Doğru denklemi: } y = 15354x + 0,007 \text{ (R}^2=0,999\text{)} \quad (4.3)$$

y: absorbans, x: derişim ve R²: korelasyon katsayısı

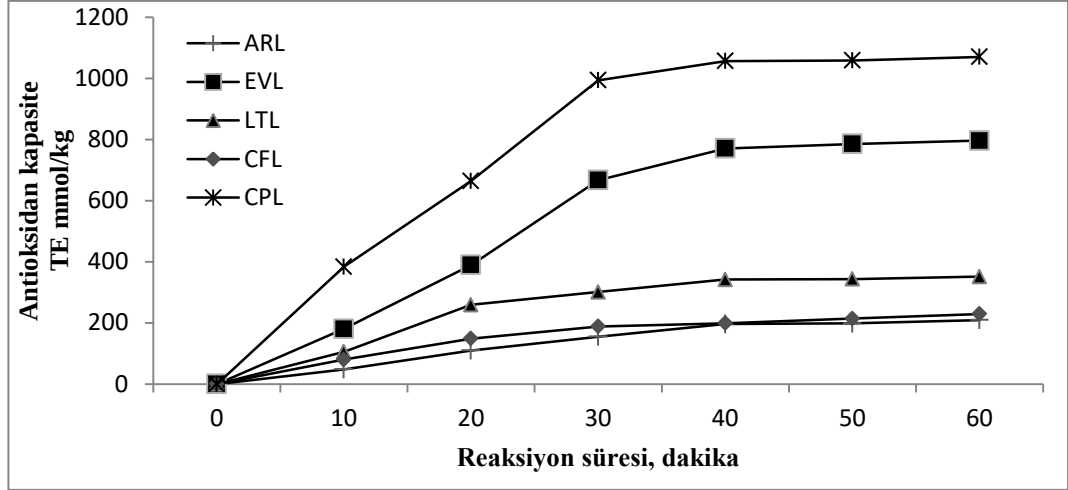
CUPRAC deneylerinden elde edilen toplam antioksidan kapasiteleri mmol TE/kg türünden belirlendi. Elde edilen sonuçları daha iyi karşılaştırmak için hazırlanan sütun grafik Şekil 4.8’de verilmiştir.

4.3.2. QUENCHER-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini İçin Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Bitki numunelerinin QUENCHER-CUPRAC yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü kullanılarak belirli reaksiyon zamanına karşı (10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika) toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TE/ kg) belirlendi ve doğrudan güneş almayacak şekilde serin ve kuru havada kurutulan numuneler için elde edilen değerler Şekil 4.5’te, liyofilizatör ile kurutulan numuneler için elde edilen değerler Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.5: Serin ve kuru havada kurutulan numunelerin QUENCHER-CUPRAC yönteminde farklı reaksiyon sürelerine karşı toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin artışı grafiği



Şekil 4.6: Liyofilizatör ile kurutulan numunelerinin QUENCHER-CUPRAC yönteminde farklı reaksiyon sürelerine karşı toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin artışı grafiği.

Bu şekillerden yararlanılarak, QUENCHER-CUPRAC yöntemiyle antioksidan aktivite tayininde reaksiyonun tamamlanması için 40 dakika'lık sürenin yeterli olacağına karar verildi.

4.3.3. QUENCHER-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

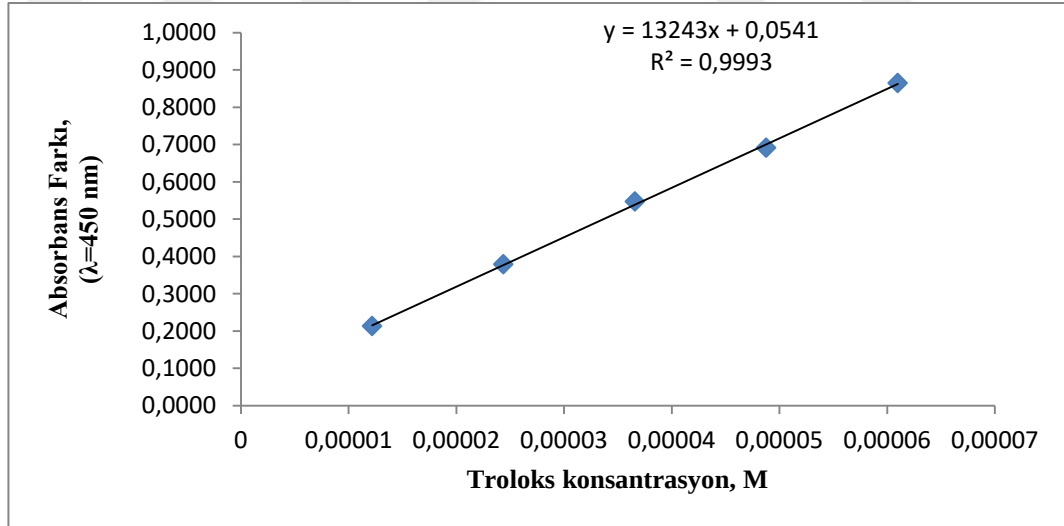
Serin ve kuru havada kurutulmuş numuneler ile liyofilizatör ile kurutulmuş numunelerin QUENCHER-CUPRAC yöntemi kullanılarak toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) tayinleri yapıldı. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken CUPRAC reaktifleri ve troloks E:S (1:1, v/v) çözücüsünde hazırlandı. Toplam antioksidan kapasite değerleri, elde edilen absorbanslar ve troloksun E:S (1:1, v/v) çözücüsünde molar absorplama katsayısı kullanılarak Denklem 3.4 yardımıyla hesaplandı. Edilen konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (denklem 4.4) Tablo 4.3'te ve QUENCHER-CUPRAC deneylerinde kullanılan troloks standardının E:S (1:1, v/v) çözücüsünde elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiği ve

deneylerden elde edilen sonuçlar Tablo 4.4’de ve elde edilen sonuçları daha iyi karşılaştırmak için hazırlanan sütun grafik Şekil 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.3: QUENCHER-CUPRAC için troloks’un etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde konsantrasyon-absorbans değerleri ve kalibrasyon doğru denklemi

Son Konsantrasyon (M)	Ortalama Absorbans
$1,22 \times 10^{-5}$	$0,2129 \pm 0,0018$
$2,44 \times 10^{-5}$	$0,3785 \pm 0,0005$
$3,66 \times 10^{-5}$	$0,5473 \pm 0,0127$
$4,88 \times 10^{-5}$	$0,6907 \pm 0,0083$
$6,10 \times 10^{-5}$	$0,8645 \pm 0,0185$

Doğru denklemi: $y = 13243x + 0,054$ ($R^2 = 0,999$) (4.4)
y: absorbans, x: derişim ve R^2 :korelasyon katsayısı



Şekil 4.7: QUENCHER-CUPRAC deneylerinde kullanılan troloks standardının E:S (1:1, v/v) çözücüsünde elde edilen kalibrasyon grafiği ($\lambda = 450$ nm)

4.3.4. CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC Tayin Yöntemleri İçin Toplam Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması

Bitki numunelerinden SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleri ile elde edilen ekstraktlara CUPRAC yöntemi ve numunelere doğrudan QUENCHER-CUPRAC yöntemi uygulanarak toplam antioksidan kapasite değerleri tayin edildi. CUPRAC yöntemi için Denklem 3.3 kullanılarak hesaplanan toplam antioksidan kapasiteleri ve QUENCHER-CUPRAC yöntemi için denklem 3.4. kullanılarak hesaplanan toplam antioksidan kapasiteleri Tablo 4.4’de gösterildi. CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC yöntemlerinin toplam antioksidan kapasiteleri karşılaştırılmaları maksadıyla Tablo 4.4 ve Şekil 4.8’de birlikte gösterilmiştir

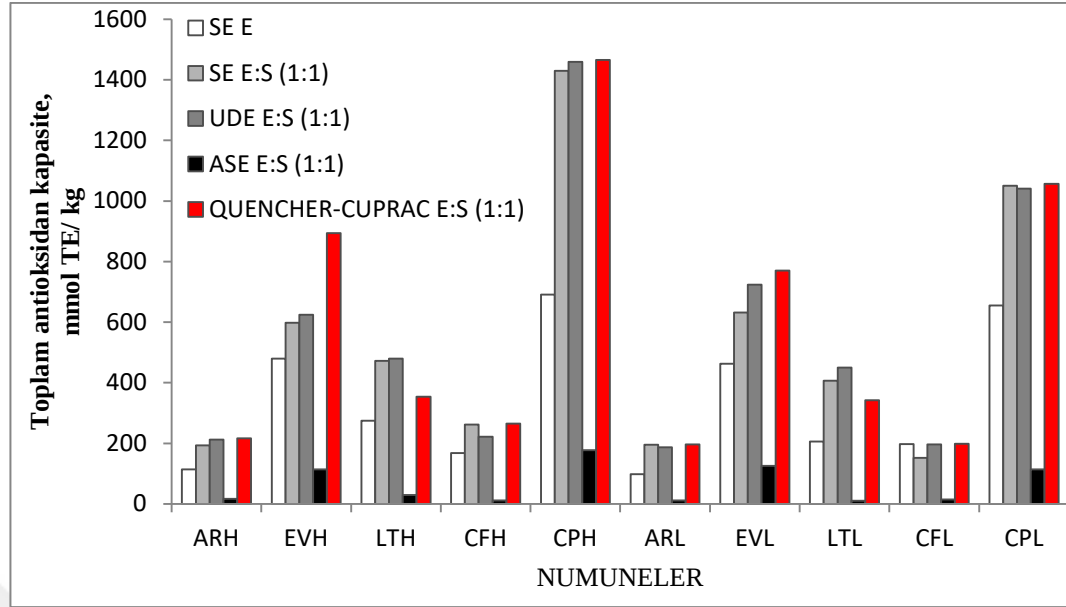
Tablo 4.4: CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması

BİTKİLER	CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasite, mmol TE/ kg				QUENCHER-CUPRAC yöntemi toplam antioksidan kapasite, mmol TE/ kg
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	
ARH	114,37±0,21 ^c	193,57±0,83 ^b	211,92±0,59 ^{ab}	17,08±0,01 ^d	216,56±0,21 ^a
EVH	479,98±1,02 ^d	597,88±0,67 ^c	624,26±1,20 ^b	113,95±0,09 ^e	894,16±1,05 ^a
LTH	274,82±0,47 ^d	471,82±1,66 ^b	479,25±1,63 ^a	29,68±0,02 ^e	353,93±0,29 ^c
CFH	167,62±0,21 ^c	261,77±1,66 ^a	221,31±1,84 ^b	11,12±0,04 ^d	264,78±0,21 ^a
CPH	691,30±1,46 ^c	1430,17±7,15 ^b	1459,48±1,88 ^a	177,27±0,06 ^d	1465,43±3,90 ^a
ARL	97,93±0,10 ^c	195,56±0,66 ^a	186,35±1,03 ^b	11,95±0,04 ^d	196,39±0,07 ^a
EVL	462,40±1,09 ^d	631,58±0,22 ^c	723,64±1,13 ^b	125,27±0,09 ^e	770,53±5,12 ^a
LTL	205,41±0,23 ^d	406,99±0,55 ^b	450,09±1,05 ^a	10,64±0,01 ^e	342,00±0,43 ^c
CFL	197,15±0,44 ^{ab}	152,33±0,82 ^c	196,19±1,80 ^b	14,65±0,09 ^d	198,98±0,35 ^a
CPL	655,04±1,90 ^c	1050,68±3,07 ^a	1041,27±2,83 ^b	114,26±0,09 ^d	1056,80±1,61 ^a

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05).

SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş, LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş, CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.



Şekil 4.8: CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin (mmol TE/kg) karşılaştırılması

Tablo 4.4 ve Şekil 4.8'e bakıldığında, ARH numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerleri QUENCHER-CUPRAC uygulamasında ($216,56 \pm 0,21$), en düşük ise ASE E:S (1:1)'de ($17,08 \pm 0,01$) ekstraktında elde edilmiştir. ARH numunesi için CUPRAC değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak QUENCHER-CUPRAC değeri ile UDE E:S(1:1) ($211,92 \pm 0,59$) ekstraktından elde edilen değer arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca UDE E:S(1:1) ile SE E:S (1:1) ($193,57 \pm 0,83$) yöntemleri arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Buna mukabil, QUENCHER-CUPRAC ve UDE E:S(1:1) grubu, SE E:S (1:1) ve UDE E:S(1:1) grubu, SE E ($114,37 \pm 0,21$) ve ASE E:S (1:1) ($17,08 \pm 0,01$) ekstraktlarına ait değerler arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$).

EVH numunesinde toplam antioksidan kapasite CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerleri en yüksek QUENCHER-CUPRAC'ta ($894,16 \pm 1,05$), en düşük ise ASE E:S (1:1)'de ($113,95 \pm 0,09$) elde edilmiştir. EVH numunesine ait ortalama CUPRAC değerleri, QUENCHER-CUPRAC, UDE E:S(1:1) ($624,26 \pm 1,20$), SE E:S (1:1)

(597,88±0,67), SE E (479,98±1,02) ve ASE E:S (1:1) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark sergilemektedirler ($p<0,05$).

LTH numunesinde toplam antioksidan kapasite CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerlerinin en yüksek UDE E:S(1:1)'de (479,25±1,63), en düşük ASE E:S (1:1)'de (29,68±0,02) elde edildiği görülmektedir. LTH numunesi için CUPRAC değerleri ortalamaları arasındaki farklar UDE E:S(1:1), SE E:S (1:1) (471,82±1,66), QUENCHER-CUPRAC (353,93±0,29), SE E (274,82±0,47), ASE E:S (1:1) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

CFH numunesinde toplam antioksidan kapasite CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerleri en yüksek QUENCHER-CUPRAC'ta (264,78±0,21), en düşük ise ASE E:S (1:1)'de (11,12±0,04) olduğu görülmektedir. CFH numunesi için CUPRAC değerleri ortalamaları arasında QUENCHER-CUPRAC ve SE E:S(1:1) (261,77±1,66) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). QUENCHER-CUPRAC ve SE E:S(1:1) yöntem grubu ile UDE E:S(1:1) (221,31±1,84), SE E (167,62±0,21), ASE E:S (1:1) yöntemleri arasındaki farklar ise anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

CPH numunesinde en yüksek CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değeri QUENCHER-CUPRAC'ta (1465,43±3,90), en düşük değer ise ASE E:S (1:1)'de (177,27±0,06) elde edilmiştir. CPH numunesi için CUPRAC değerleri ortalamaları arasında QUENCHER-CUPRAC ve UDE E:S(1:1) (1459,48±1,88) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Öte yandan QUENCHER-CUPRAC ve UDE E:S(1:1) yöntem grubu ile SE E:S(1:1) (1430,17±7,15), SE E (691,30±1,46) ve ASE E:S (1:1) yöntemlerinden elde edilen değerler arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

ARL numunesi için toplam antioksidan kapasite CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerleri en yüksek QUENCHER-CUPRAC'ta ($196 \pm 0,35$), en düşük ise ASE E:S (1:1)'de ($11,95 \pm 0,04$) elde edildi. Bu numune için QUENCHER-CUPRAC ve SE E:S(1:1) ($195,56 \pm 0,66$) yöntemlerinden elde edilen değerler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). QUENCHER-CUPRAC ve SE E:S(1:1) yöntem grubu ile UDE E:S(1:1) ($186,35 \pm 1,03$), SE E ($97,93 \pm 0,10$), ASE E:S (1:1) yöntemlerinden elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

EVL numunesinde en yüksek toplam antioksidan kapasite CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerinin QUENCHER-CUPRAC'ta ($770,53 \pm 5,12$), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'den ($125,27 \pm 0,09$) elde edildiği görülmektedir. EVL numunesi CUPRAC değerleri ortalamaları arasında, QUENCHER-CUPRAC, UDE E:S(1:1) ($723,64 \pm 1,13$), SE E:S (1:1) ($631,58 \pm 0,22$), SE E ($462,40 \pm 1,09$) ve ASE E:S (1:1) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

LTL numunesinde toplam antioksidan kapasite CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerleri en yüksek UDE E:S(1:1)'de ($450,09 \pm 1,05$), en düşük ASE E:S (1:1)'de ($10,64 \pm 0,01$) bulundu. LTL numunesi için CUPRAC ortalama değerleri arasında UDE E:S(1:1), SE E:S (1:1) ($406,99 \pm 0,55$), QUENCHER-CUPRAC ($342 \pm 0,43$), SE E ($205,41 \pm 0,23$) ve ASE E:S (1:1) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

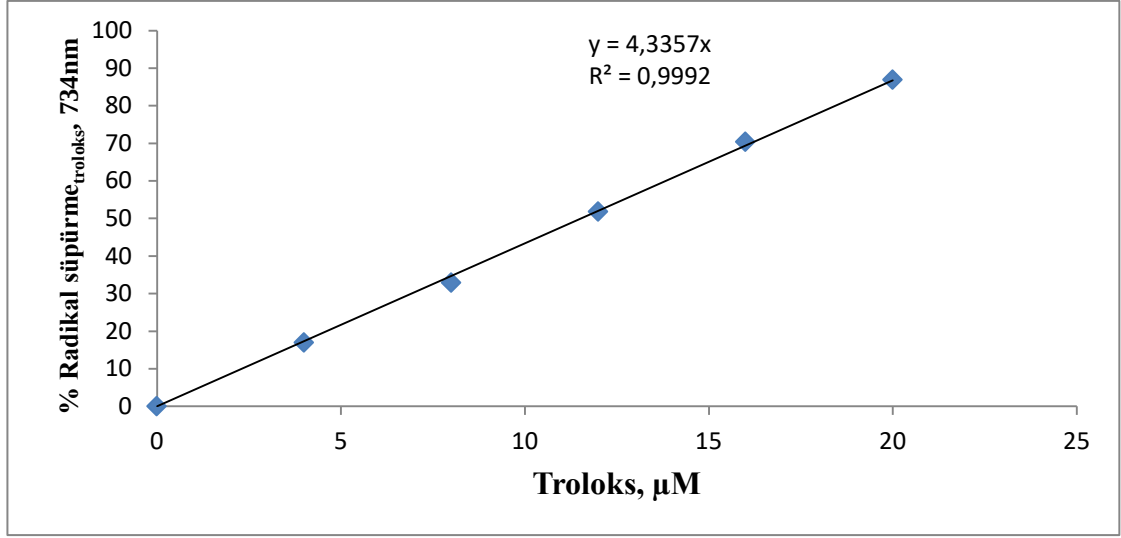
CFL numunesinde CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerleri en yüksek QUENCHER-CUPRAC'ta ($198,98 \pm 0,35$), en düşük ASE E:S (1:1)'de ($14,65 \pm 0,09$) elde edildi. Bu numune için CUPRAC ortalama değerleri arasında QUENCHER-CUPRAC ve SE E:S (1:1) ($197,15 \pm 0,44$) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca SE E ve UDE E:S(1:1) ($196,19 \pm 1,80$) yöntemleri açısından da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). QUENCHER-CUPRAC ve SE E grubu, SE E ve UDE E:S(1:1) grubu, SE E:S (1:1) ($152,33 \pm 0,82$) ve

ASE E:S (1:1) yöntemlerinden elde edilen değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$).

CPL numunesinde toplam antioksidan kapasite CUPRAC (mmol TE/kg kuru numune) değerleri en yüksek düzeyde QUENCHER-CUPRAC'tan elde edildi ($1056,80\pm1,61$). En düşük değer ise ASE E:S (1:1)'de ($114,26\pm0,09$) bulundu. CPL numunesi CUPRAC ortalama değerleri arasında QUENCHER-CUPRAC ve SE E:S (1:1) ($1050,68\pm3,07$) yöntemleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). QUENCHER-CUPRAC ve SE E:S(1:1) yöntem grubu ile UDE E:S(1:1) ($1041,27\pm2,83$), SE E ($655,04\pm1,90$), ASE E:S (1:1) yöntemleri açısından ise anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

4.3.5. ABTS Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

Numunelerin SE, UDE ve ASE yöntemleriyle elde edilen ekstraktlarının ABTS yöntemi ile toplam antioksidan kapasite tayinleri yapıldı. Toplam antioksidan kapasite değerleri, etanol:su (1:1, v/v)'da çözülen troloks'un farklı konsantrasyonlarına karşı % radikal süpürme değerleri ile çizilen grafiğinden, Denklem 3.5 yardımıyla hesaplandı. Kalibrasyon grafiği Şekil 4.9'da, buradan elde edilen sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir.

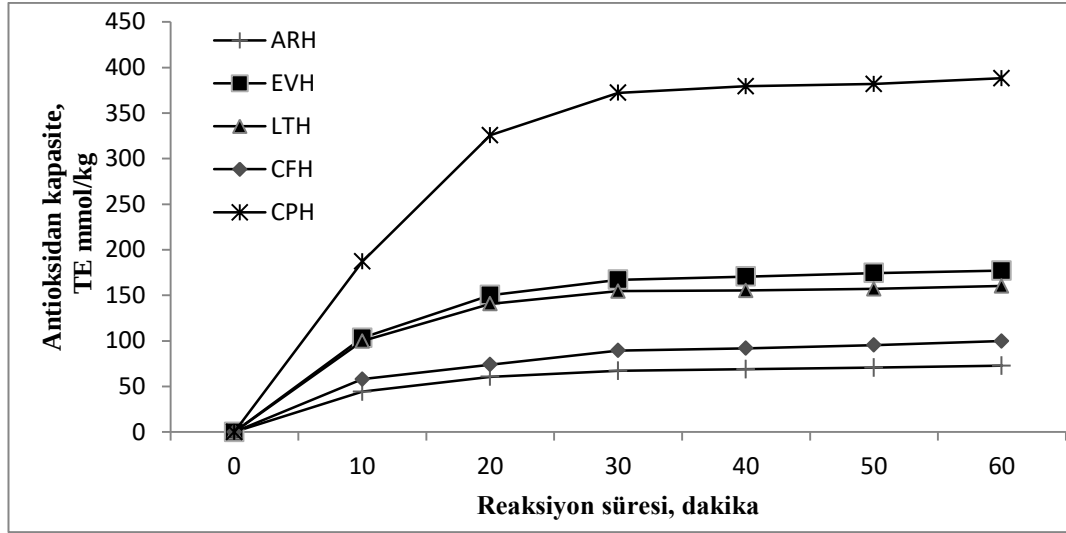


Şekil 4.9: ABTS deneylerinde kullanılan, troloks'un etanol:su (1:1) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarının absorbansına karşı % radikal süpürme_{trolox} grafiği ($\lambda=734$ nm)

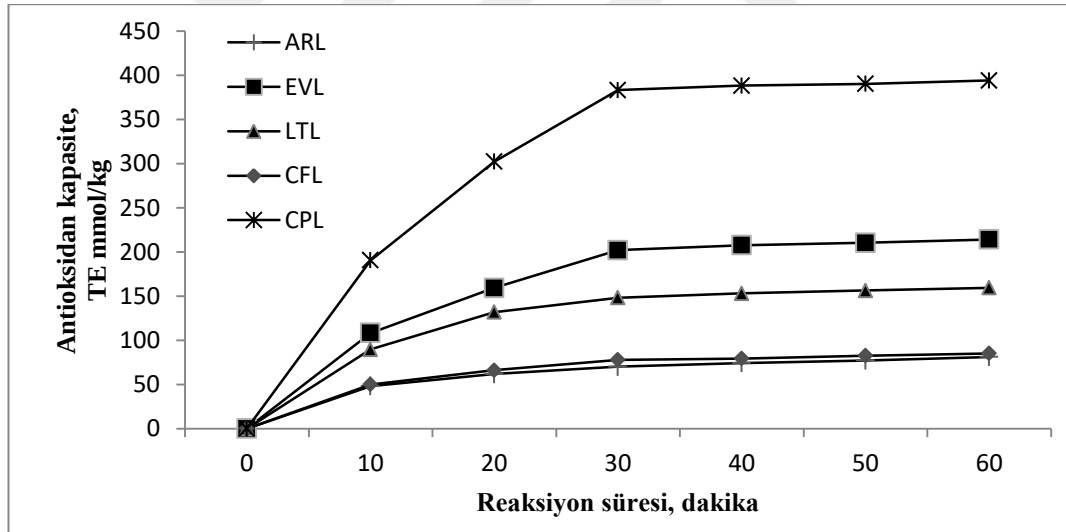
4.3.6. QUENCHER-ABTS Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini İçin Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Bitki numunelerinin QUENCHER-ABTS yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsü kullanılarak belirli reaksiyon zamanına karşı belirli reaksiyon zamanına karşı (10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika) toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TE/ kg) belirlendi. Serin ve kuru havada nemi kalmayacak şekilde kurutulan numuneler için elde edilen değerler Şekil 4.10'da, liyofilizatör ile nemi kalmayacak şekilde kurutulan numuneler için elde edilen değerler Şekil 4.11'de verilmiştir.

Bitki numunelerinin SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleri ile elde edilen ekstraktlarına ABTS yöntemi, doğrudan katı numuneye ise QUENCHER-ABTS yöntemi uygulanarak toplam antioksidan kapasiteleri mmol TE/ kg kuru numune cinsinden tayin edildi. ABTS ve QUENCHER-ABTS yöntemlerinin toplam antioksidan kapasiteleri değerlerinin bir karşılaştırması Çizelge 4.5 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.10: Serin ve kuru havada kurutulan numunelerin QUENCHER-ABTS yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı reaksiyon süreleri için 734 nm’de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerleri grafiği

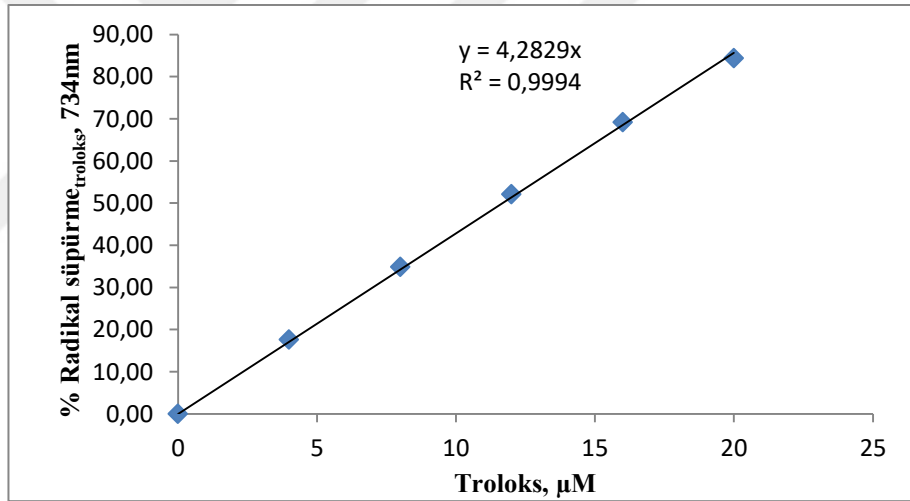


Şekil 4.11: Liyofilizatör ile kurutulan numunelerinin QUENCHER-ABTS yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı reaksiyon süreleri için 734 nm’de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerleri grafiği

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’den reaksiyonun tamamlanması için 30 dakika reaksiyon süresinin yeterli olduğuna karar verildi.

4.3.7. QUENCHER-ABTS Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

Bitkilerin serin ve kuru havada kurutulmuş ve liyofilizatör ile nemi kalmayacak şekilde kurutulmuş halleri QUENCHER-ABTS yöntemi ile toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TE/ kg) tayini yapıldı. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken ABTS reaktifi ve troloks etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde hazırlandı. Toplam antioksidan kapasite değerleri, elde edilen absorbanslar ve troloksun etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı konsantrasyonlarının absorbansına karşı troloksun % radikal süpürme değerleri denklem 3.5'ten hesaplanarak elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12: QUENCHER-ABTS deneylerinde kullanılan, troloks'un etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarının absorbansına karşı troloks'un % radikal süpürme_{troloks} grafiği ($\lambda=734$ nm).

QUENCHER-ABTS yöntemiyle toplam antioksidan kapasiteleri tayini değerleri Denklem 4.5 (Serpen ve ark., 2012a)'de ki gibi mmol TE/ kg kuru numune cinsinden hesaplandı ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.5'te ve elde edilen sonuçları daha iyi karşılaştırmak için hazırlanan sütun grafik Şekil 4.13'te verilmiştir.

$$\text{mmol TE/kg kuru bitki} = [(\% \text{ radikal süpürme}_{\text{örnek}} / S_{\text{ABTS}} \times m) * 10] \quad (4.5)$$

burada;

s: ABTS için troloks'un etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı konsantrasyonlarının absorbansına karşı troloks'un % radikal süpürme grafiğinin eğimini ($S_{\text{ABTS}}:4,282$) m: kuru örneğin mg kütlesini belirtmektedir.

4.3.8. ABTS ve QUENCHER-ABTS Tayin Yöntemleri İçin Toplam Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması

Bitki numunelerinin SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleri ile elde edilen ekstraktlara ABTS yöntemi ve bitki numunelerine doğrudan uygulanan QUENCHER-ABTS yöntemi kullanılarak toplam antioksidan kapasiteleri mmol TE/ kg kuru numune cinsinden tayin edildi. ABTS ve QUENCHER-ABTS yöntemlerinin toplam antioksidan kapasiteleri karşılaştırılması için Tablo 4.5 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

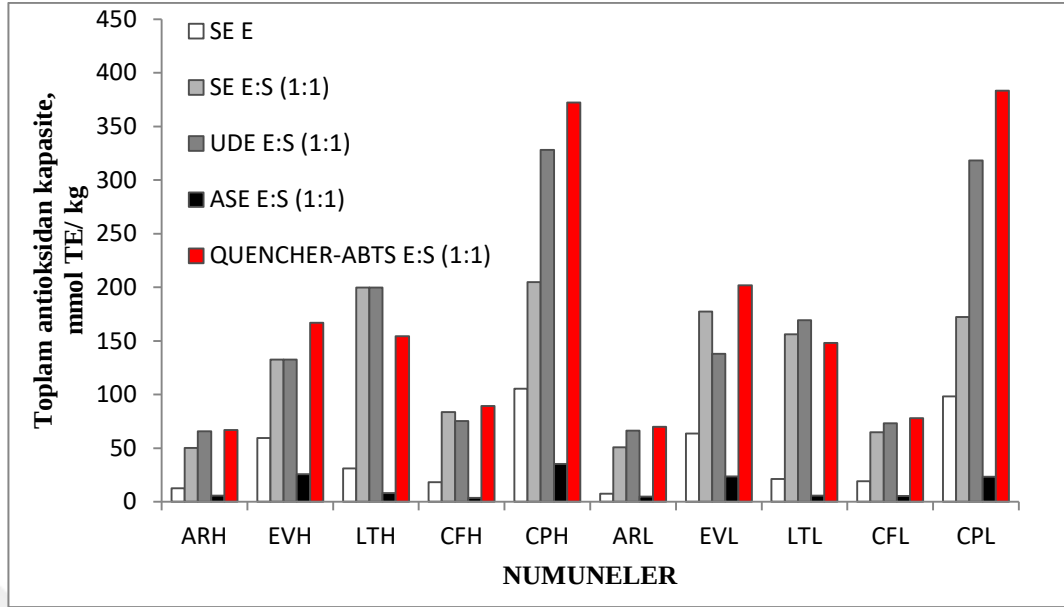
Tablo 4.5: ABTS ve QUENCHER-ABTS yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması

BİTKİLER	ABTS yöntemi toplam antioksidan kapasite, mmol TE/kg				QUENCHER-ABTS yöntemi toplam antioksidan kapasite, mmol TE/kg
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	
ARH	12,62±0,03 ^c	50,37±1,63 ^b	65,93±1,63 ^a	5,67±0,21 ^d	67,12±0,21 ^a
EVH	59,45±1,03 ^d	120,56±5,23 ^c	132,67±0,53 ^b	25,86±0,32 ^e	167,04±4,98 ^a
LTH	31,13±0,15 ^d	177,68±12,75 ^b	199,86±3,29 ^a	8,23±0,04 ^e	154,47±5,45 ^c
CFH	18,40±0,03 ^d	83,64±2,28 ^b	75,29±2,17 ^c	3,84±0,25 ^e	89,33±1,67 ^a
CPH	105,39±1,02 ^d	205,04±6,26 ^c	328,29±0,52 ^b	35,40±0,90 ^e	372,25±4,61 ^a
ARL	7,75±0,25 ^d	50,94±1,64 ^c	66,31±0,58 ^b	4,94±0,12 ^d	70,02±1,78 ^a
EVL	63,72±0,37 ^d	177,38±2,53 ^b	138,02±2,61 ^c	23,59±0,08 ^e	202,02±3,16 ^a
LTL	21,24±0,03 ^d	156,27±1,63 ^b	169,42±0,79 ^a	5,77±0,18 ^e	148,16±4,53 ^c
CFL	19,16±0,53 ^c	64,91±4,01 ^b	73,27±0,79 ^a	5,42±0,44 ^e	77,94±0,35 ^a
CPL	98,21±1,29 ^d	172,44±0,96 ^c	318,44±0,96 ^b	23,37±0,06 ^e	383,32±2,61 ^a

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d,e) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (P<0,05).

SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş, LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş, CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.



Şekil 4.13: Numune ekstraktları ve katı numunelerin ABTS ve QUENCHER-ABTS yöntemleriyle elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması

Tablo 4.5 ve Şekil 4.13'e bakıldığında, ARH numunesi için ABTS toplam antioksidan kapasite değerinin en yüksek olduğu yöntemin QUENCHER-ABTS ($67,12 \pm 0,21$), en düşük olduğu yöntemin ise ASE E:S (1:1)'de ($5,67 \pm 0,21$) olduğu görülmektedir. ARH numunesinde gerçekleştirilen ABTS toplam antioksidan kapasite değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak bir fark olup olmadığına bakıldı. QUENCHER-ABTS ve UDE E:S(1:1) ($65,93 \pm 1,63$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). QUENCHER-ABTS ve UDE E:S(1:1) yöntem grubu ile SE E:S(1:1) ($50,37 \pm 1,63$), SE E ($12,62 \pm 0,03$), ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

EVH numunesi için ABTS toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek QUENCHER-ABTS'de ($167,04 \pm 4,98$), en düşük ise ASE E:S (1:1)'de ($25,86 \pm 0,32$) olduğu görülmektedir. EVH numuneside kullanılan tüm yöntemler için ABTS toplam antioksidan kapasite değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ($p < 0,05$).

LTH numunesinde ABTS toplam antioksidan kapasite değerlerinin en yüksek olduğu yöntem UDE E:S(1:1) ($199,86 \pm 3,29$) olarak bulundu. En düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de ($8,23 \pm 0,04$) elde edildiği görülmektedir. Bu numune için de uygulanan tüm yöntemler açısından elde edilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmaktadır ($p < 0,05$).

CFH numunesinde ABTS toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek olan yöntemin QUENCHER- ABTS ($89,33 \pm 1,67$), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de ($3,84 \pm 0,25$) bulunduğu görülmektedir. Bu numune için tüm yöntemler açısından ortalamalar istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklıdır ($p < 0,05$).

CPH numunesinde ABTS toplam antioksidan kapasite değerlerinin en yüksek olduğu yöntem QUENCHER- ABTS ($372,25 \pm 4,61$) olarak elde edildi. En düşük değer ise ASE E:S (1:1)'de elde edildi ($35,40 \pm 0,90$). Burada da tüm ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,05$).

ARL numunesi için ABTS toplam antioksidan kapasite değerlerinin en yüksek olduğu yöntem QUENCHER-ABTS'dir ($70,02 \pm 1,78$). En düşük değeri ise ASE E:S (1:1)'de ($4,94 \pm 0,12$) elde edildi. SE E ($7,75 \pm 0,25$) ve ASE E:S (1:1) yöntemleriyle elde edilen ortalamalar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p > 0,05$). Bu iki yöntem ile diğer yöntemler olan UDE E:S(1:1) ($66,31 \pm 0,58$), SE E:S(1:1) ($50,94 \pm 1,64$) ve QUENCHER-ABTS arasında önemli bir fark olduğu belirlendi. Son üç yöntemin kendi arasında da istatistiksel manada anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

EVL numunesi için ABTS toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek olan yöntemin QUENCHER- ABTS ($202,02 \pm 3,16$), en düşük olanın ise ASE E:S (1:1) ($23,59 \pm 0,08$) olduğu görülmektedir. Burada da tüm yöntemlerle elde edilen ortalamalar arasında anlamlı farklılıkların olduğu bulundu ($p < 0,05$).

LTL numunesinde ABTS toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek olan yöntemin UDE E:S(1:1) ($169,42 \pm 0,79$), en düşük olanın ise ASE E:S (1:1) ($5,77 \pm 0,18$) olduğu görülmektedir. Bu numune için tüm yöntemlerle elde edilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu bulundu ($p < 0,05$).

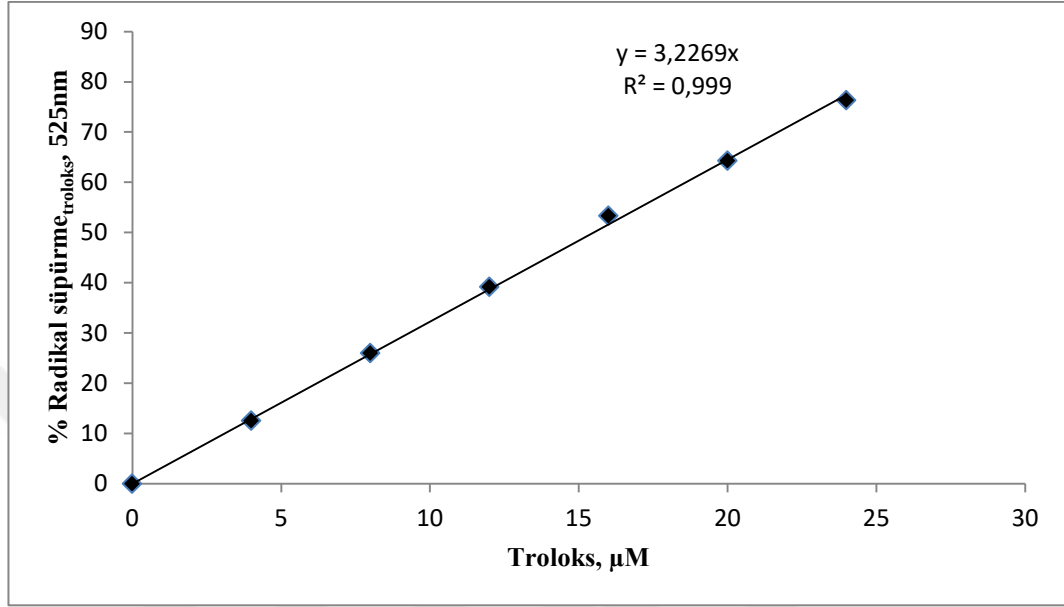
CFL numunesinde ABTS toplam antioksidan kapasite değerini en yüksek QUENCHER-ABTS'de ($77,94 \pm 0,35$), en düşük ise ASE E:S (1:1)'de ($5,42 \pm 0,44$) olduğu görülmektedir. İstatistiksel olarak QUENCHER-ABTS ve UDE E:S(1:1) ($73,27 \pm 0,79$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmamışken ($p > 0,05$), bu iki yöntemle elde edilen ortalamalar ile diğer yöntem ortalamalarının anlamlı farklılıklar sergiledikleri bulundu. Ayrıca diğer yöntemlerin kendi aralarında da farklı oldukları belirlendi ($p < 0,05$).

CPL numunesi için ABTS toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek olan yöntemin QUENCHER- ABTS ($383,32 \pm 2,61$) olduğu, en düşük değeri ise ASE E:S (1:1) yönteminin sergilediği ($23,37 \pm 0,06$) bulundu. CPL numunesinden elde edilen ABTS toplam antioksidan kapasite değerleri ortalamaları arasında yöntemler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu görülmektedir ($p < 0,05$).

4.3.9. DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

Bitkilerin SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleriyle ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktların DPPH yöntemi ile toplam antioksidan kapasiteleri tayinleri yapıldı. Toplam antioksidan kapasite değerleri, etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde çözülen troloks'un farklı konsantrasyonlarına karşı % radikal süpürme değerleri grafiğinden Denklem 3.5 yardımıyla hesaplandı. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen sonuçlar Tablo

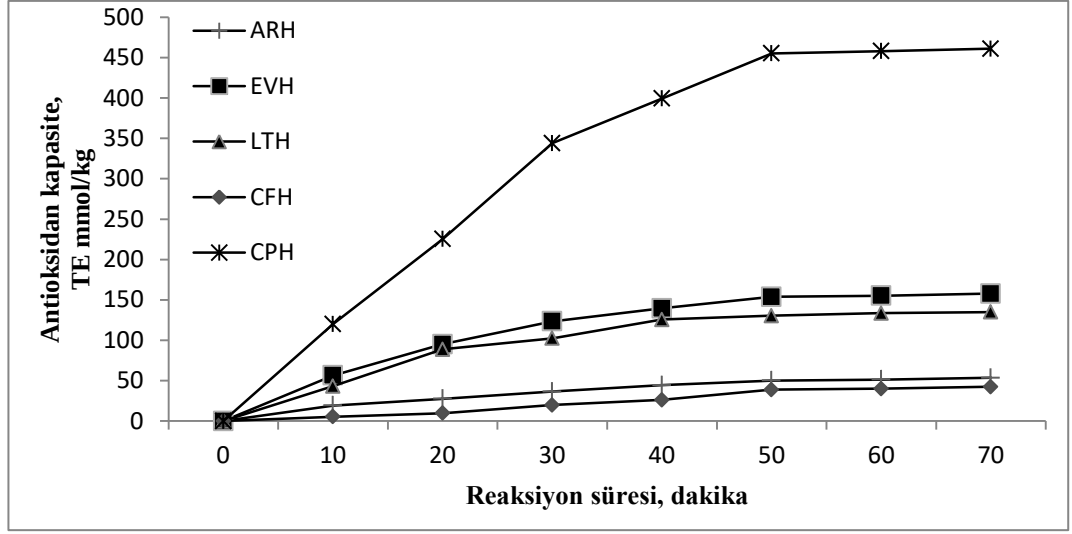
4.6’da ve elde edilen sonuçları daha iyi karşılaştırmak için hazırlanan sütun grafik Şekil 4.18’te verilmiştir.



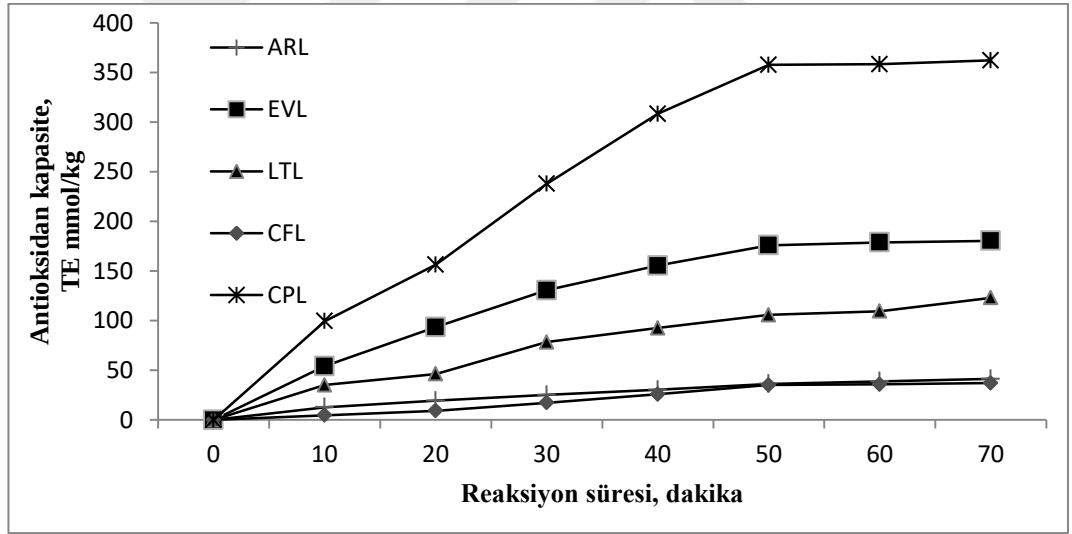
Şekil 4.14: DPPH deneylerinde kullanılan, etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki troloks’un farklı konsantrasyonlarına karşı % radikal süpürme grafiği ($\lambda=525$ nm)

4.3.10. QUENCHER-DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini İçin Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

DPPH yöntemi kullanılarak numunelerin toplam antioksidan kapasitelerinin (mmol TE/kg) belirli reaksiyon zamanına (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dakika) karşı değişimi incelendi. Serin ve kuru havada kurutulan numuneler için elde edilen değerler Şekil 4.15’te, liyofilizatör ile kurutulan numuneler için elde edilen değerler Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.15: Serin ve kuru havada kurutulan numunelerin QUENCHER-DPPH yöntemi ile farklı reaksiyon süreleri için 525 nm’de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin değişimi grafiği

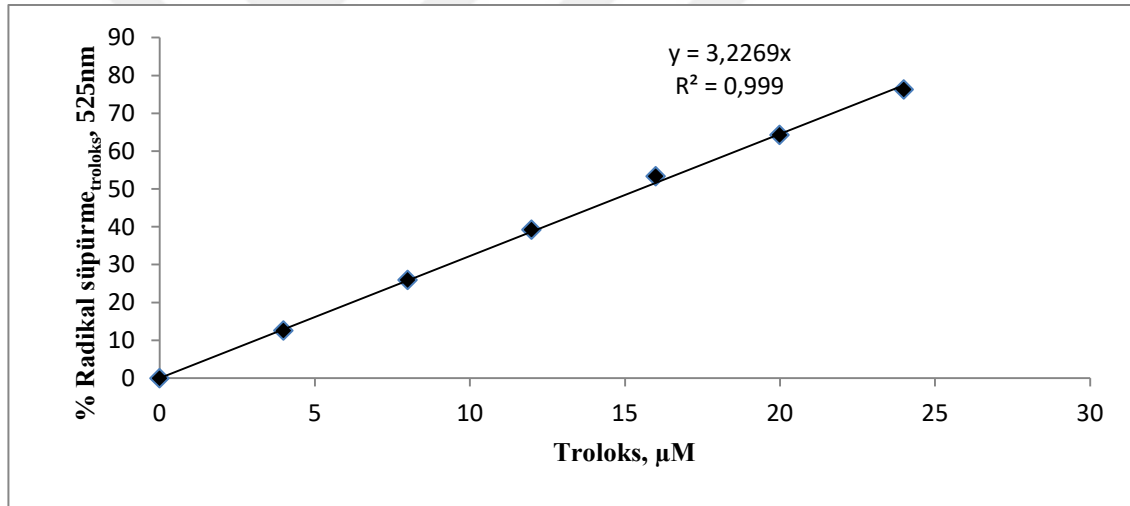


Şekil 4.16: Liyofilizatör ile kurutulan numunelerin QUENCHER-DPPH yöntemi ile farklı reaksiyon süreleri için 525 nm’de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin değişimi grafiği

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’den elde edilen sonuçlara göre reaksiyonun tamamlanması için 50 dakika reaksiyon süresinin yeterli olduğuna karar verildi.

4.3.11. QUENCHER-DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

Hava kurusu numuneler ile liyofilizatör yardımıyla kurutulmuş numuneler için QUENCHER-DPPH yöntemi kullanılarak toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) tayinleri yapıldı. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken DPPH reaktifi ve troloks etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde hazırlandı. Toplam antioksidan kapasite değerleri, troloksun etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarına karşı % radikal süpürme değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiğinden (Şekil 4.17) ve Denklem 3.5'ten hesaplandı.



Şekil 4.17: QUENCHER-DPPH deneylerinde kullanılan, troloks'un etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarına karşı % radikal süpürme grafiği ($\lambda=525$ nm)

QUENCHER-DPPH yöntemiyle toplam antioksidan kapasiteleri tayini değerleri Denklem 4.6 (Serpen ve ark., 2012a)'de ki gibi mmol TE/kg kuru bitki cinsinden hesaplandı.

$$\text{mmol TE/kg kuru bitki} = [(\% \text{ Radikal süpürme}_{\text{örnek}} / S_{\text{DPPH}} \times m) \times 10] \quad (4.6)$$

burada;

S_{DPPH} : DPPH için troloks'un etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı konsantrasyonlarının absorbansına karşı troloks'un % radikal süpürme grafiğinin eğimini ($S_{DPPH:3,276}$) m: kuru örneğin mg kütlesini belirtmektedir.

QUENCHER-DPPH yöntemi deneylerinden elde edilen sonuçlar diğer yöntemlerle beraber Tablo 4.6'da, daha iyi karşılaştırma yapabilmek adına çizilen sütun grafik ise Şekil 4.18'de verilmiştir.

4.3.12. DPPH ve QUENCHER-DPPH Tayin Yöntemleri İçin Toplam Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması

Bitki numunelerden SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleri ile elde edilen ekstraktlara DPPH yöntemi, doğrudan bitki numunelerine ise QUENCHER-DPPH yöntemi uygulanarak, numnelerin toplam antioksidan kapasite değerleri mmol TE/kg kuru numune cinsinden tayin edildi.

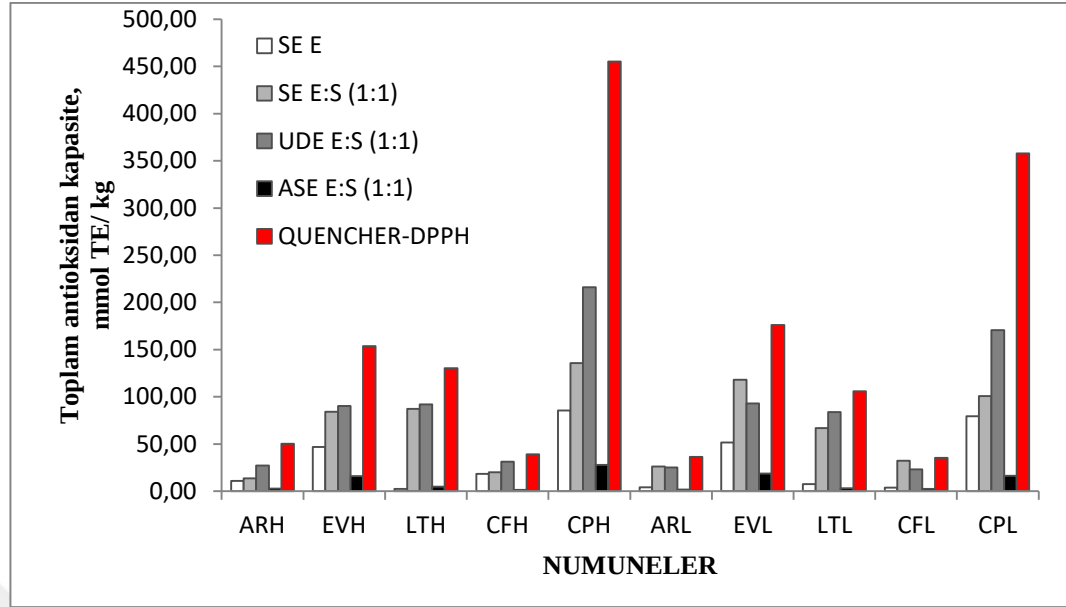
Tablo 4.6: DPPH ve QUENCHER-DPPH yöntemleriyle hesaplanan toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması

BİTKİLER	DPPH yöntemi toplam antioksidan kapasite, mmol TE/kg				QUENCHER-DPPH yöntemi toplam antioksidan kapasite, mmol TE/kg
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	
ARH	10,95±0,50 ^d	13,67±0,15 ^c	27,09±0,90 ^b	2,63±0,03 ^e	50,11±1,05 ^a
EVH	46,69±2,04 ^d	84,32±0,79 ^c	90,38±1,99 ^b	16,09±0,64 ^e	153,82±1,72 ^a
LTH	2,46±1,70 ^c	87,30±1,58 ^b	91,88±3,11 ^b	4,97±0,1 ^c	130,35±1,50 ^a
CFH	18,45±0,75 ^d	20,19±0,46 ^c	31,11±0,12 ^b	1,43±0,02 ^e	38,90±1,05 ^a
CPH	85,57±3,88 ^d	135,76±3,57 ^c	216,19±1,42 ^b	27,75±0,22 ^e	455,19±5,32 ^a
ARL	4,18±0,11 ^c	26,25±1,13 ^b	25,26±0,44 ^b	1,76±0,08 ^d	36,27±0,43 ^a
EVL	51,70±1,05 ^d	117,92±1,50 ^b	92,90±2,02 ^c	18,74±1,53 ^e	176,02±8,93 ^a
LTL	7,67±2,09 ^d	66,85±0,73 ^c	83,87±2,23 ^b	3,11±0,23 ^d	105,76±3,70 ^a
CFL	3,72±0,20 ^c	32,33±1,24 ^a	23,07±2,95 ^b	2,28±0,04 ^c	35,18±1,29 ^a
CPL	79,49±0,86 ^d	100,63±0,43 ^c	170,72±1,13 ^b	16,50±0,09 ^e	357,82±12,46 ^a

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d,e) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05).

SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş, LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş, CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.



Şekil 4.18: Numune ekstraktları ve katı numunelerin DPPH ve QUENCHER-DPPH yöntemleriyle elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin (mmol TE/kg) karşılaştırılması

ARH numunesinde DPPH toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg kuru numune) değeri en yüksek olarak QUENCHER-DPPH yönteminde ($50,11 \pm 1,05$), en düşük ise ASE E:S (1:1)'de ($2,63 \pm 0,03$) yönteminde elde edildi. Bu numunede tüm yöntemler için elde edilen DPPH toplam antioksidan ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu bulundu ($p < 0,05$).

EVH numunesinde DPPH toplam antioksidan kapasite değerinin en yüksek olduğu yöntem QUENCHER-DPPH ($153,82 \pm 1,72$), en düşük olduğu yöntemin ise ASE E:S (1:1)'de ($16,09 \pm 0,64$) olduğu görülmektedir. Tüm yöntemler için elde edilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

LTH numunesinde en yüksek DPPH toplam antioksidan kapasite değeri QUENCHER-DPPH'ta ($130,35 \pm 1,50$), en düşük değer ise SE E'de ($2,46 \pm 1,70$) elde edilmiştir. LTH numunesi için DPPH toplam antioksidan kapasite değeri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olup olmadığına bakıldı. UDE E:S (1:1) ($91,88 \pm 3,11$)

ile SE E:S (1:1) ($87,30 \pm 1,58$) yöntemleri arasında ve ASE E:S (1:1) ($4,97 \pm 0,1$) ile SE E ($2,46 \pm 1,70$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). QUENCHER-DPPH'tan elde edilen toplam antioksidan kapasite değerinin diğer yöntemlerden elde edilenlerden anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

CFH numunesinde DPPH toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek olan yöntemin QUENCHER- DPPH olduğu ($38,90 \pm 1,05$), ASE E:S (1:1) ise en düşük değeri sergilediği ($1,43 \pm 0,02$) görülmektedir. CFH numunesi için tüm yöntemler açısından ortalamalar arasında istatistiksel manada anlamlı farklar olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).

CPH numunesi için yapılan testlerde, DPPH toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek yöntemin QUENCHER-DPPH ($455,19 \pm 5,32$), en düşük yöntemin ise ASE E:S (1:1) ($27,75 \pm 0,22$) olduğu belirlenmiştir. Bu numune için tüm yöntemler arasında elde edilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

ARL numunesi için DPPH toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek olan yöntemin QUENCHER-DPPH ($36,27 \pm 0,43$) olduğu, ASE E:S (1:1) ($1,76 \pm 0,08$) yönteminin ise en düşük değere sahip olduğu görülmektedir. Yapılan anlamlılık testlerinde SE E:S(1:1) ($26,25 \pm 1,13$) ile UDE E:S(1:1) ($25,26 \pm 0,44$) yöntemlerinden elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p > 0,05$). SE E:S(1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemlerinin diğer yöntemler olan QUENCHER-DPPH, SE E ($4,18 \pm 0,11$) ve ASE E:S (1:1) yöntemlerinden farklı olduğu, ayrıca bu yöntemlerin kendi aralarında da anlamlı farklılıklar gösterdiği ortaya kondu ($p < 0,05$).

EVL numunesinde gerçekleştirilen DPPH toplam antioksidan kapasite değerleri arasında en yüksek olanı QUENCHER- DPPH ($176,02 \pm 8,93$) yönteminden, en düşük olan değerin ise ASE E:S (1:1)'de ($18,74 \pm 1,53$) yönteminden elde edildiği

gösterilmiştir. Bu numunede de tüm yöntemler açısından elde edilen ortalamalar arasında anlamlı farklılıklar olduğu bulundu ($p<0,05$).

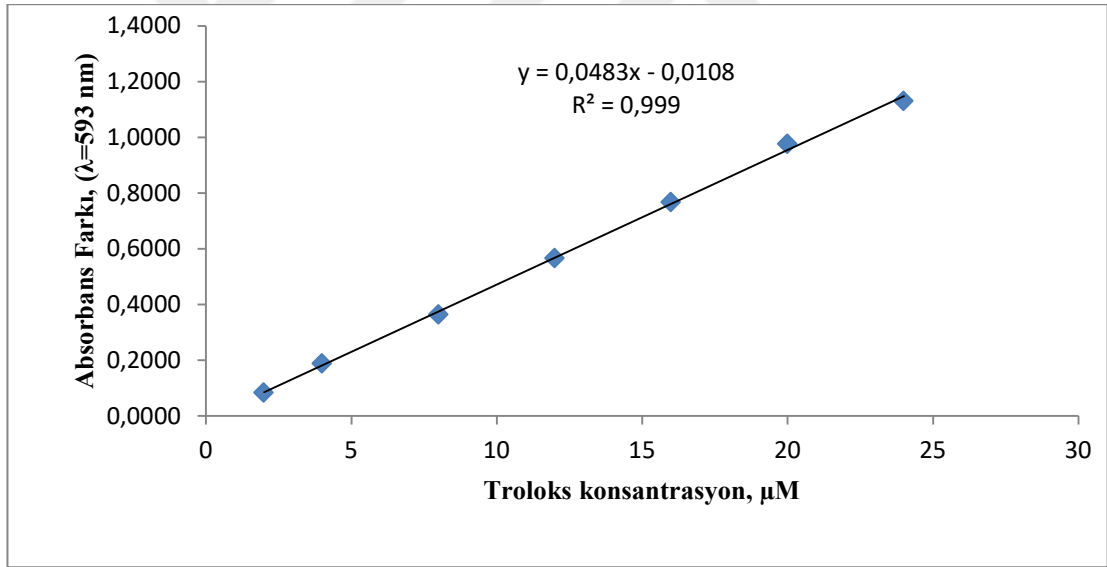
ARL numunesi için yapılan DPPH toplam antioksidan kapasite deneylerinden elde edilen ortalama değerler arasında en yüksek olanı QUENCHER-DPPH'tan elde edildi ($105,76\pm3,70$). En düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'den elde edildiği ortaya kondu ($3,11\pm0,23$). Yapılan anlamlılık testlerinde SE E ($7,67\pm2,09$) ile ASE E:S (1:1) ($3,11\pm0,23$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Bu yöntemler ile diğer QUENCHER-DPPH, UDE E:S(1:1) ($83,87\pm2,23$), SE E:S (1:1) ($66,85\pm0,73$) yöntemleri arasında önemli farklar olduğu, ayrıca bu son üç yöntemden elde edilen ortalamaların kendi aralarında da anlamlı farklılıklar sergiledikleri belirlendi ($p<0,05$).

CFL numunesi için DPPH toplam antioksidan kapasite değeri en yüksek QUENCHER-DPPH'ta ($35,18\pm1,29$), en düşük SE E'de ($2,28\pm0,04$) elde edildi. Yapılan anlamlılık testlerinde bu numune için QUENCHER-DPPH ile SE E:S (1:1) ($32,33\pm1,24$) yöntemleri ve SE E ($3,72\pm0,20$) ile ASE E:S(1:1) ($2,28\pm0,04$) yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). UDE E:S (1:1)'den elde edilen ortalamanın ise diğer yöntemlerle elde edilenlerden anlamı derecede farklı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

CPL numunesinde gerçekleştirilen DPPH toplam antioksidan kapasite deneylerinden elde edilen ortalamalardan QUENCHER-DPPH ($357,82\pm12,46$) en yüksek değeri ortaya koymuşken, en düşük değeri ise ASE E:S (1:1) ($16,50\pm0,09$) sergilemiştir. Bu numune için elde edilen tüm ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulundu ($p<0,05$).

4.3.13. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

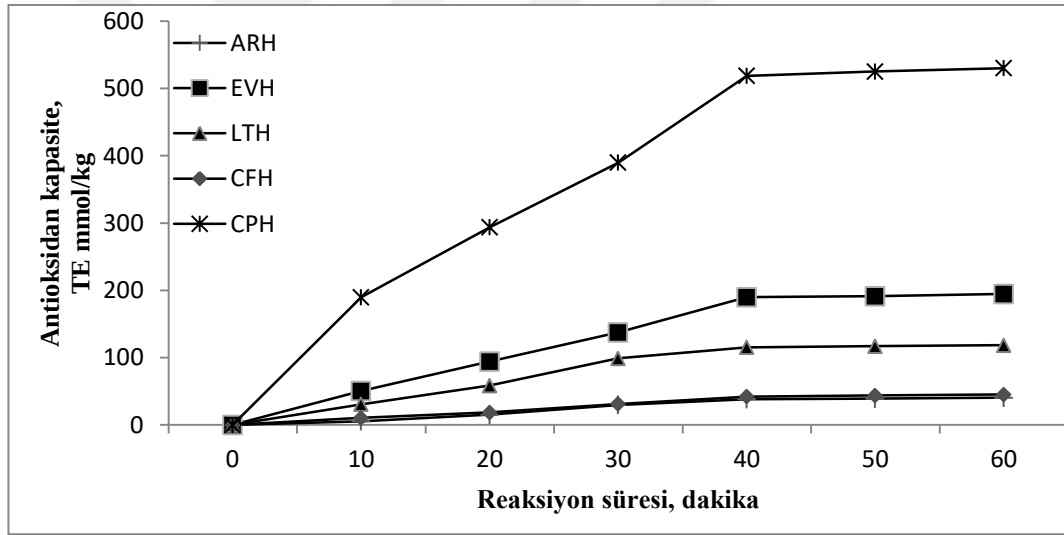
Bitki numunelerinin SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraksiyonlarından elde edilen ekstraktlarına FRAP yöntemi ile toplam antioksidan kapasiteleri tayini uygulandı. Toplam antioksidan kapasite değerlerinin tespiti için standart olarak kullanılan troloks'un etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarına karşı çizilen absorbans grafiği kalibrasyon grafiği olarak kullanılmış ve Şekil 4.19'te gösterilmiştir. Numunelerin hesaplanan FRAP değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir. Daha iyi bir karşılaştırma yapmak adına bu veriler kullanılarak çizilen sütun grafik Şekil 4.22'de verilmiştir.



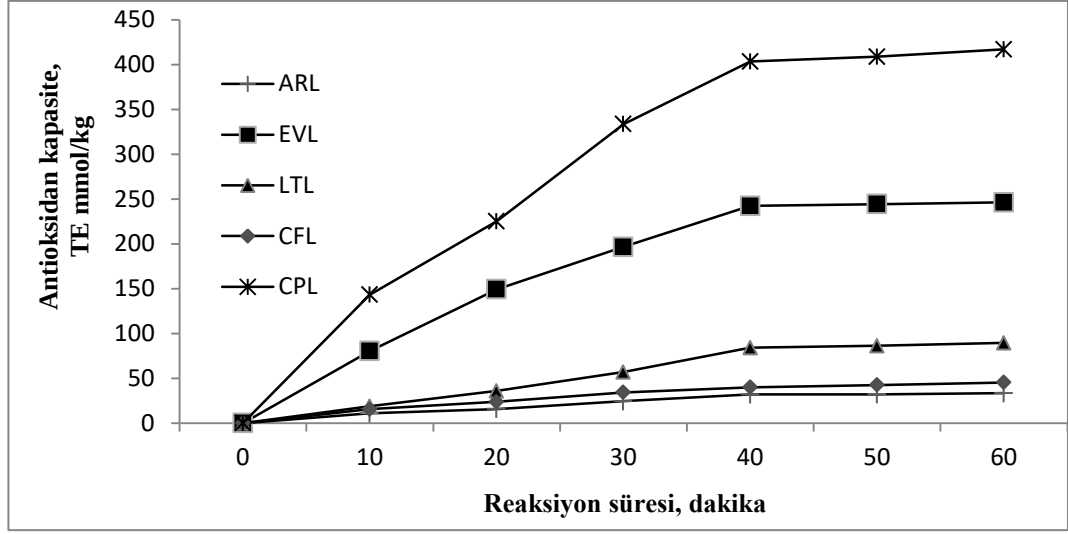
Şekil 4.19: FRAP testleri için standart olarak kullanılan troloks'un, etanol:su (1:1, v/v) çözücüsündeki farklı konsantrasyonlarının, absorbanslarına karşı çizilen kalibrasyon grafiği (λ=593 nm)

4.3.14. QUENCHER-FRAP Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini İçin Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Bitki numunelerinin tümüne QUENCHER-FRAP yönteminin uygulanmasından önce numunelerin etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde belirli reaksiyon zamanlarına karşı (10, 20, 30, 40, 50, 60 dakika) toplam antioksidan kapasiteleri (mmol TE/kg) belirlenerek zaman optimizasyonu yapıldı. Bitki örnekleri için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Şekil 4.19’da gösterilen kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı ve Şekil 4.20’de verildi. Liyofilizatör ile kurutulan numuneler için elde edilen değerler ise Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.20: Hava kurusu numunelerin QUENCHER-FRAP yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı reaksiyon sürelerine karşı 593 nm’de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin artışı grafiği.



Şekil 4.21: Liyofilizatör ile kurutulmuş numunelerinin QUENCHER-FRAP yöntemi ile etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı reaksiyon sürelerine karşı 593 nm’de ölçülen toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) değerlerinin artışı grafiği.

QUENCHER-FRAP yöntemiyle antioksidan aktivite tayini deneylerinden elde edilen Şekil 4.20. ve Şekil 4.21’de ki sonuçlara göre reaksiyonun tamamlanması için 40 dakika reaksiyon süresinin yeterli olduğuna karar verildi.

4.3.15. QUENCHER-FRAP Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

Havada ve liyofilizatör ile kurutulmuş numuneler için QUENCHER-FRAP yöntemi ile toplam antioksidan kapasite (mmol TE/kg) tayini yapıldı. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken FRAP reaktifleri ve troloks, etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde hazırlandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19’da gösterilen kalibrasyon grafiği kullanarak Denklem 4.7’den (Serpen ve ark., 2012a) mmol TE/kg kuru numune cinsinden hesaplandı. Tablo 4.7’de verildi. QUENCHER-FRAP yöntemi deneylerinden elde edilen sonuçları daha iyi karşılaştırmak için hazırlanan sütun grafik ise Şekil 4.22’de verilmiştir.

$$\text{mmol TE/ kg kuru bitki} = [(Abs_{593nm} - 0,01 / S_{FRAP} \times m)] \times 10 \quad (4.7)$$

burada;

S_{FRAP} : FRAP için troloks'un etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde farklı konsantrasyonlarının absorbansına karşı grafiğinin eğimini (S_{FRAP} :0,048), m: kuru örneğin mg kütlesini belirtmektedir (m:10 mg).

4.3.16. FRAP ve QUENCHER-FRAP Yöntemi Toplam Antioksidan Kapasiteleri Tayinlerinin Karşılaştırılması

Orijinal FRAP ve katı numunelere doğrudan uygulanabilen QUENCHER-FRAP yöntemlerinden elde edilen sonuçlar topluca Tablo 4.7 ve Şekil 4.22'de verilmektedir.

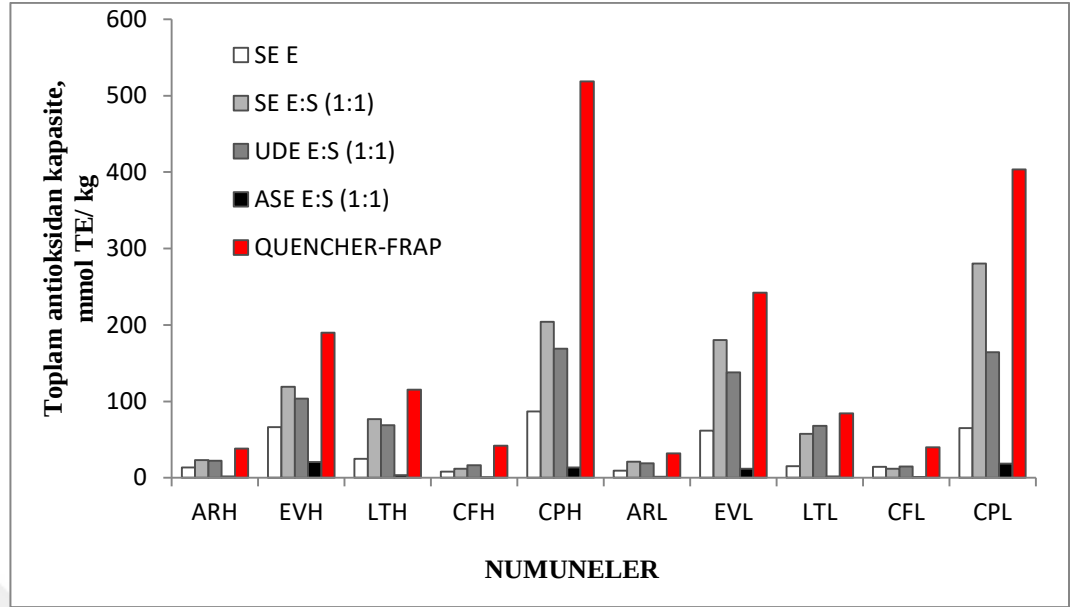
Tablo 4.7: FRAP ve QUENCHER-FRAP yöntemlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması

BİTKİLER	FRAP yöntemi toplam antioksidan kapasite, mmol TE/kg				QUENCHER-FRAP yöntemi toplam antioksidan kapasite, mmol TE/kg
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	
ARH	13,53±0,55 ^c	23,38±0,36 ^b	22,51±0,18 ^b	1,80±0,04 ^d	38,35±2,08 ^a
EVH	66,42±3,92 ^d	119,19±1,83 ^b	103,47±4,14 ^c	20,81±0,53 ^e	189,75±8,66 ^a
LTH	24,78±1,22 ^c	76,76±3,69 ^b	68,98±0,78 ^b	3,38±0,05 ^d	115,31±5,33 ^a
CFH	8,34±0,04 ^d	11,96±0,54 ^c	16,47±0,89 ^b	0,81±0,03 ^e	42,22±0,05 ^a
CPH	86,96±2,61 ^d	204,18±3,22 ^b	169,09±0,52 ^c	13,50±0,07 ^e	518,78±7,88 ^a
ARL	9,46±1,16 ^d	21,34±0,41 ^b	19,19±0,13 ^c	1,36±0,09 ^e	31,93±0,45 ^a
EVL	61,92±1,64 ^d	180,32±7,91 ^b	137,89±0,78 ^c	11,86±0,39 ^e	242,38±11,15 ^a
LTL	15,18±0,04 ^d	57,39±1,26 ^c	67,88±1,48 ^b	1,91±0,03 ^e	84,22±5,10 ^a
CFL	14,63±0,19 ^b	11,93±0,38 ^c	14,72±0,84 ^b	1,16±0,03 ^e	40,08±1,60 ^a
CPL	65,15±3,37 ^d	280,50±2,71 ^b	164,58±3,49 ^c	18,44±0,08 ^e	403,47±19,41 ^a

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d,e) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05).

SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş, LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş, CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.



Şekil 4.22: FRAP ve QUENCHER-FRAP yöntemlerinden elde edilen toplam antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırma grafiği.

Bitki ekstraktlarına FRAP ve QUENCHER-FRAP yöntemi uygulanarak belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerine (mmol TE/kg kuru numune) bakıldığında;

ARH numunesi için toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değeri en yüksek olan QUENCHER-FRAP uygulamasından elde edildi ($38,35 \pm 2,08$). En düşük değerin ise ASE E:S (1:1) yönteminden elde edildiği görülmektedir ($1,80 \pm 0,04$). ARH numunesi için toplam antioksidan kapasite FRAP değerleri ortalamaları açısından SE E:S (1:1) ($23,38 \pm 0,36$) ve UDE E:S (1:1) ($22,51 \pm 0,18$) yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p > 0,05$). SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) yöntemleri ile diğer QUENCHER-FRAP, SE E ($13,53 \pm 0,55$), ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında istatistiksel olarak önemli farklar olduğu belirlendi ($p < 0,05$).

EVH numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değerlerinin QUENCHER-FRAP yönteminden ($189,75 \pm 8,66$), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1)'de ($20,81 \pm 0,53$) yönteminden elde edildiği görülmektedir. Bu

bitki için uygulanan tüm yöntemlerden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmaktadır ($p<0,05$).

LTH numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değerlerinin QUENCHER-FRAP yönteminden ($115,31\pm5,33$), en düşük değerin ise ASE E:S (1:1) yönteminden ($3,38\pm0,05$) elde edildiği görülmektedir. LTH numunesi için toplam antioksidan kapasite FRAP değerleri ortalamaları açısından SE E:S (1:1) ($76,76\pm3,69$) ve UDE E:S (1:1) ($68,98\pm0,78$) yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$). SE E:S(1:1) ve UDE E:S (1:1) yöntemleri ile diğer QUENCHER-FRAP, SE E ($24,78\pm1,22$), ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p<0,05$).

CFH numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değeri QUENCHER-FRAP yönteminden ($42,22\pm0,05$), en düşük değeri ise ASE E:S (1:1)'den ($0,81\pm0,03$) elde edildi. Bu bitki için FRAP değerleri ortalamaları açısından uygulanan tüm yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

CPH numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değeri QUENCHER-FRAP yöntemi ($518,78\pm7,88$), en düşük değeri ise ASE E:S (1:1) yöntemi ($13,50\pm0,07$) ortaya koydu. CPH numunesine için de uygulanan tüm ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

EVL numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değeri QUENCHER-FRAP yönteminden ($242,38\pm11,15$), en düşük değeri ise ASE E:S (1:1)'den ($11,86\pm0,39$) elde edildiği görülmektedir. EVL numunesinin tüm ekstraktlarından ve katı numuneye doğrudan uygulanan QUENCHER-FRAP

yönteminden elde edilen FRAP değerleri açısından aralarında anlamlı farklar olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

LTL numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değeri QUENCHER-FRAP uygulamasında ($84,22\pm5,10$), en düşük değer ise ASE E:S (1:1)'den elde edilen ekstraktta bulunmuştur ($1,91\pm0,03$). Toplam antioksidan kapasite FRAP değerleri ortalamaları açısından QUENCHER-FRAP, UDE E:S(1:1) ($67,88\pm1,48$), SE E:S (1:1) ($57,39\pm1,26$), SE E ($15,18\pm0,04$) ve ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

CFL numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değerleri QUENCHER-FRAP uygulamasından ($40,08\pm1,60$), en düşük değer ise ASE E:S (1:1) ekstraktından ($1,16\pm0,03$) elde edilmiştir. Toplam antioksidan kapasite FRAP değerleri ortalamaları açısından ise UDE E:S (1:1) ($14,72\pm0,84$) ve SE E ($14,63\pm0,19$) yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$). UDE E:S (1:1) ve SE E yöntemleri ile diğer QUENCHER-FRAP, SE E:S (1:1) ($14,63\pm0,19$), ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında önemli bir fark olduğu belirlendi ($p<0,05$).

CPL numunesi için en yüksek toplam antioksidan kapasite FRAP (mmol TE/kg kuru numune) değeri QUENCHER-FRAP'tan ($403,47\pm19,41$), en düşük değer ise ASE E:S (1:1)'den ($18,44\pm0,08$) elde edildiği görülmektedir. Toplam antioksidan kapasite FRAP değerleri ortalamaları açısından tüm yöntemler arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

4.4. LC-MS/MS ile Fenolik Bileşiklerinin Belirlenmesi ve Kantitatif Analizi

Havada ve liyofilizatörde kurutulmuş tüm numunelerden elde edilen ekstraktların (parçacık boyutu<125 µm) fenolik bileşik profillerinin belirlenmesi için LC–MS/MS analizi gerçekleştirildi.

LC-MS/MS çalışmasında 19 adet fitokimyasal standart maddenin kalitatif ve kantitatif analizi için bir metot hazırlanarak validasyon çalışmaları gerçekleştirildi. LC-MS/MS analiz metoduna ait fenolik bileşiklerin MRM geçişleri için en uygun koşullar alıkonma zamanı (RT), ana (parent) iyonlar, standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), parçalanma (fragment) iyonları, konsantrasyon aralığı (ng/mL), iyon modu, bekleme süresi (dwell time, ms), fragmentor (V), çarpışma enerjisi (V) (CE) Tablo 4.8’de ve analiz edilen fenolik bileşikler için belirleme alt sınırı (LOD) (µg/L), ve tayin alt sınırı (LOQ) (µg/L), kalibrasyon denklemi, belirleme katsayısı (R^2), bağıl standart sapma (RSD), geri kazanım (%) gibi analitik parametreler Tablo 4.9’da verilmiştir.

LC-MS/MS metodunda kullanılan fitokimyasal bileşikler ve sınıfları şunlardır:

- ❖ Fenolik asitler (13 adet): Gallik asit protokatekuik asit, gentisik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, *p*-kumarik asit, rozmarinik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, salisilik asit, benzoik asit, ferulik asit.
- ❖ Fenolik aldehit (3 adet): Vanilin, siringaldehit, protokatekaldehit.
- ❖ Flavanol (2 adet): Kateşin hidrat, epigallokateşin galat.
- ❖ Vitamin (1 adet): Askorbik asit.

Tablo 4.8: Fenolik bileşiklerin MRM geçişleri için en uygun koşullar.

No	Bileşik	RT ^a	Ana (parent) iyon (m/z) ^b	Parçalanma (Fragment) iyonları	Konsantrasyon aralığı (ng/mL)	İyon modu	Bekleme süresi (Dwell time) (ms)	Parçalanma enerjisi (Fragmentor) (V)	Çarpışma enerjisi (CE) (V)
1	Askorbik asit	1,02±0,01	175,0	115,0 - 87,0	25-10000	Negatif	5	80	10
2	Gallik asit	2,11±0,01	169,0	125,0 - 79,0	25-10000	Negatif	5	90	15
3	Protokatekuik asit	3,44±0,03	153,0	109,2 - 91,2	25-10000	Negatif	5	90	6
4	Protokatekaldehit	4,45±0,02	137,0	109,1 - 92,1	25-10000	Negatif	5	90	20
5	Gentisik asit	4,54±0,05	153,0	108,0 - 81,0	25-10000	Negatif	5	90	10
6	Kateşin hidrat	4,81±0,01	289,1	203,2 - 109,0	25-10000	Negatif	5	90	25
7	Klorojenik asit	4,88±0,01	353,1	190,9 - 84,9	25-10000	Negatif	5	90	35
8	Vanilik asit	5,02±0,01	167,1	152,1 - 108,0	25-10000	Negatif	5	90	30
9	Kafeik asit	5,11±0,01	179,0	135,0 - 88,8	25-10000	Negatif	5	90	40
10	Epigallokateşin gallat	5,12±0,02	457,1	169,0 - 125,0	25-10000	Negatif	5	90	35
11	Siringik asit	5,20±0,01	197,0	182,1 - 122,9	25-10000	Negatif	5	90	12
12	Vanilin	5,51±0,01	151,1	136,0 - 92,2	25-10000	Negatif	5	90	12
13	Siringaldehit	5,86±0,04	181,1	166,0 - 151,0	25-10000	Negatif	5	90	12
14	<i>p</i> -Kumarik asit	5,89±0,01	163,0	119,1-93,0	25-10000	Negatif	5	90	9
15	Rosmarinik asit	5,96±0,11	359,1	160,9 -133,0	12-5000	Negatif	5	100	40
16	<i>p</i> -hidroksi benzoik asit	6,13±0,01	137,1	93,1 - 65,1	25-10000	Negatif	5	90	30
17	Salisilik asit	6,13±0,01	137,0	93,0 - 65,0	25-10000	Negatif	5	80	30
18	Benzoik asit	6,20±0,10	121,0	92,7 - 77,0	25-10000	Negatif	5	90	9
19	Ferulik asit	6,35±0,09	193,0	178,1 - 134,0	25-10000	Negatif	5	90	10

^aRT: Alıkonma zamanı(n=10) , ^bAna iyon(m/z):Standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı),

Tablo 4.9: LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler

No	Bileşik	LOD (ng/mL) ^a	LOQ (ng/mL) ^b	Kalibrasyon denklemi	R ^{2c}	% RSD ^d		% geri kazanım	% geri kazanım %RSD
						Aynı Gün (intra- day)	Farklı Günler (inter-day)		
1	Askorbik Asit	0,92	3,24	y=-7,34x ² -14,68x-647,75	0,99977	1,95	0,61	93,13	8,96
2	Gallik asit	2,85	9,39	y=74,859505x	0,99760	1,68	6,64	105,57	5,66
3	Protokatekuik asit	2,97	9,81	y=75,515315x	0,99705	1,07	1,26	100,87	10,48
4	Protokatekaldehit	0,64	2,10	y=-0,002064x ² +45,89x	0,99024	1,08	5,33	98,05	7,12
5	Gentisik asit	0,75	2,46	y=-0,001767x ² +51,96x	0,99862	1,22	6,30	101,10	9,62
6	Kateşin hidrat	0,56	1,83	y= -4,54*10 ⁻⁴ x ² +7,9x+324,70	0,99726	3,88	4,29	113,40	5,16
7	Klorojenik asit	0,10	0,34	y= -0,005470x ² 109,53x+2016,58	0,99990	1,61	1,44	83,14	7,65
8	Vanilik asit	0,83	2,72	y= -6,50*10 ⁻⁴ x ² +11,87x	0,99809	8,51	9,56	95,50	10,69
9	Kafeik asit	0,95	3,14	y= -1,61*10 ⁻⁴ x ² +2,1x+290,29	0,99340	4,02	2,08	102,28	6,19
10	Epigallokateşin gallat	0,22	0,74	y=-0,003152x ² +55,65x	0,99574	7,70	8,55	99,35	4,9
11	Siringik asit	0,77	2,53	y= -4,36*10 ⁻⁴ x ² +8,37x+440,76	0,99829	2,19	0,93	105,23	2,15
12	Vanilin	0,36	1,17	y=40,44x+981,46	0,99404	1,83	2,62	102,15	2,67
13	Siringaldehit	0,53	1,17	y= -8,52*10 ⁻⁴ x ² +16,68x	0,99998	2,27	9,71	85,76	6,91
14	p-Kumarik asit	0,21	0,71	y= -0,005601x ² +115,77x+8752,57	0,99893	2,19	2,46	107,81	10,03
15	Rozmarinik asit	1,23	4,06	y= -1,11*10 ⁻⁴ x ² +8,13x-63,97	0,99828	2,19	2,12	118,19	7,03
16	p-hidroksi benzoik asit	0,62	2,05	y= -0,012232x ² +291,93x+24270,40	0,99953	2,70	6,83	105,72	3,95
17	Salisilik asit	0,51	1,67	y= -0,012232x ² +291,93x+24270,40	0,99953	2,70	4,60	105,72	3,95
18	Benzoik asit	0,62	2,05	y= -2,57*10 ⁻⁵ x ² +0,63x-73,67	0,99899	4,11	6,20	102,62	7,06
19	Ferulik asit	0,67	2,23	y= -6,95*10 ⁻⁴ x ² +20,79x-574,03	0,99978	5,56	6,55	95,30	6,52

^aLOD: Belirleme alt sınırı, ^bLOQ (µg/L) :Tayin alt sınırı, ^cR²: Belirleme katsayısı, ^dRSD: Bağlı standart sapma

4.4.1. LC-MS/MS Metod Validasyon Parametreleri

Çalışmada LC-MS/MS metod validasyon parametrelerinin performans özellikleri standart eklenmiş (spike) ve standart eklenmemiş örnekler kullanılarak belirlenmiştir.

4.4.2. Doğrusallık (Lineerite)

19 adet fitokimyasal standart bileşiğin kalitatif ve kantitatif analizi için LC-MS/MS metodundaki standartların lineer aralığının belirlenmesinde 3 tekrarlı 25, 50, 250, 1000, 2500, 10000 ng/mL konsantrasyonlarında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerine ait denklemler ve korelasyon katsayıları (R^2) Tablo 4.9’da gösterilmiştir.

4.4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) ve Geri Kazanım (Gerçeklik)

Oluşturulan LC-MS/MS metodunun tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmaları belirlenen bir ekstrakta aynı günde altı tekrar olacak şekilde ve farklı günler içersinde (3 farklı günde) altışar tekrar olacak şekilde düşük ve yüksek konsantrasyonlarda standart ekleme yapılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı gün içinde ve farklı günler arasında (3 farklı günde) yapılan ölçümler sonucunda, tekrarlanabilirlik ve tekrarlanabilirlik % RSD, geri kazanım ve geri kazanım % RSD değerleri belirlenerek Tablo 4.9’ da gösterilmiştir.

Geri Kazanım=Bulunan miktar/standart ekleme yapılan miktar

% Geri Kazanım= 100 x Geri Kazanım

Ortalama ($\bar{X}$) = $(X_1+X_2+\dots+X_n)/n$

$$\text{Standart sapma } \sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

$$\text{RSD} = (\text{Standart sapma} / \text{Ortalama}) \times 100$$

4.4.4. Belirleme Alt Sınırları (LOD) ve Tayin Alt Sınırları (LOQ)

LC-MS/MS metodunda kullanılan standartların belirleme alt sınırları (LOD) ve tayin alt sınırları (LOQ) belirlenmesinde analit içermeyen ekstraktan hazırlanan standartların sinyal verdiği en düşük derişimde standart ilave yapılarak 10 defa cihaza enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmış ve Tablo 4.9’da gösterilmiştir.

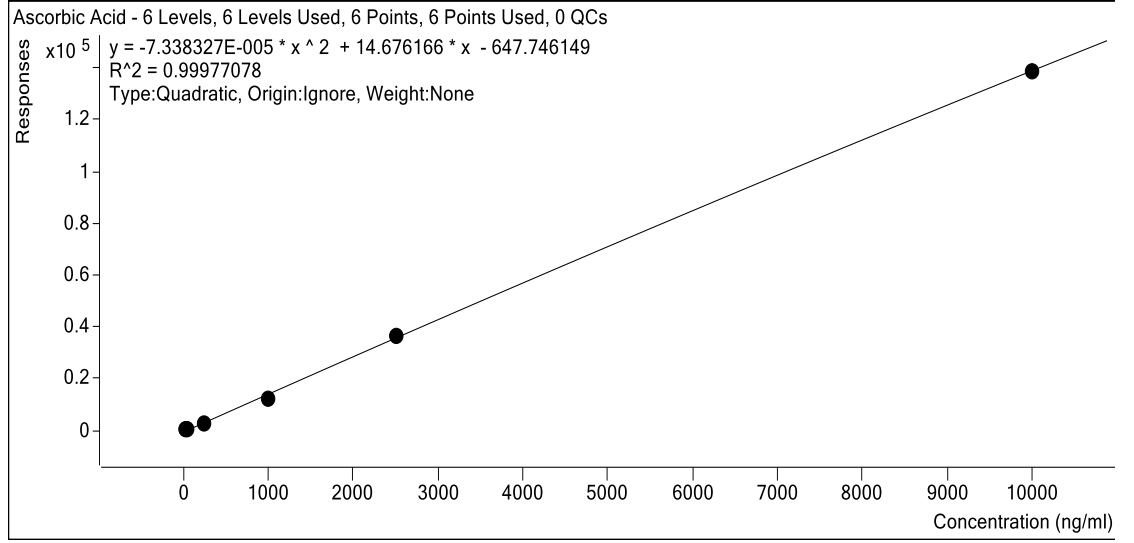
$$\text{LOD} = 3 \times [\text{verilen konsantrasyonun ortalaması} / (\text{S/N}) \text{ ortalaması}]$$

$$\text{LOQ} = 10 \times [\text{verilen konsantrasyonun ortalaması} / (\text{S/N}) \text{ ortalaması}]$$

Burada; S/N= Sinyal/Gürültü oranını belirtir (Bijlsma, 2014).

4.4.5. LC-MS/MS Metodundaki Standartların Kalibrasyon Grafikleri

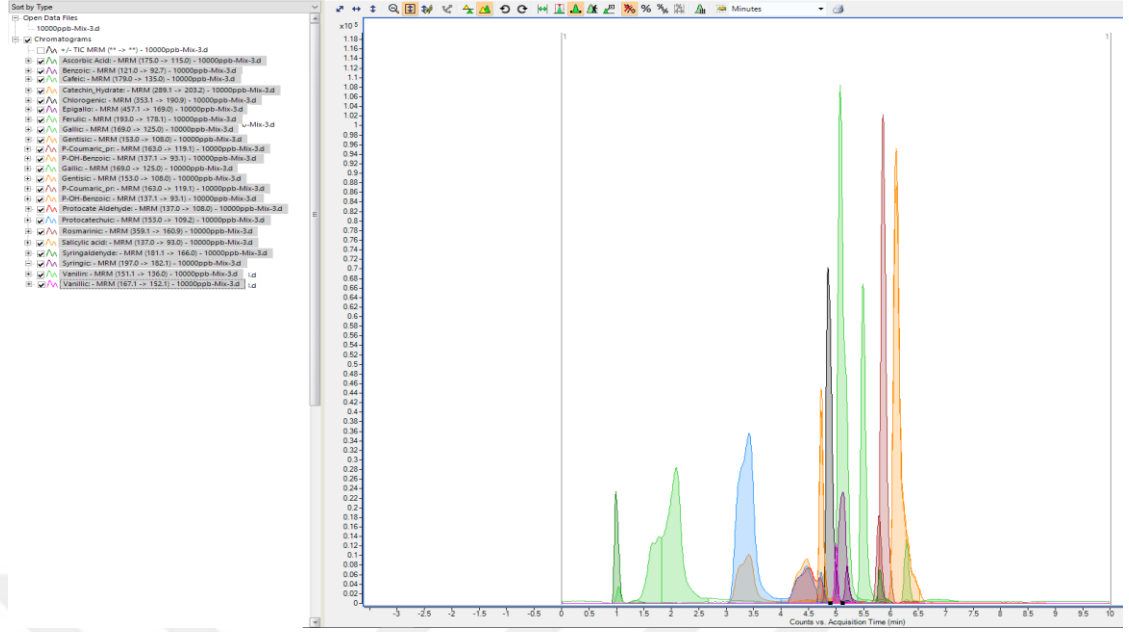
19 adet fitokimyasal standart maddenin LC-MS/MS metodu ile kalitatif ve kantitatif analizini gerçekleştirmek için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerine ait grafikler, denklemler ve belirleme katsayıları (R^2) Ek Şekil 19-36’da gösterilmiştir. Burada örnek olarak Askorbik asit’e ait kalibrasyon grafiği aşağıdaki Şekil 4.23’te görülmektedir.



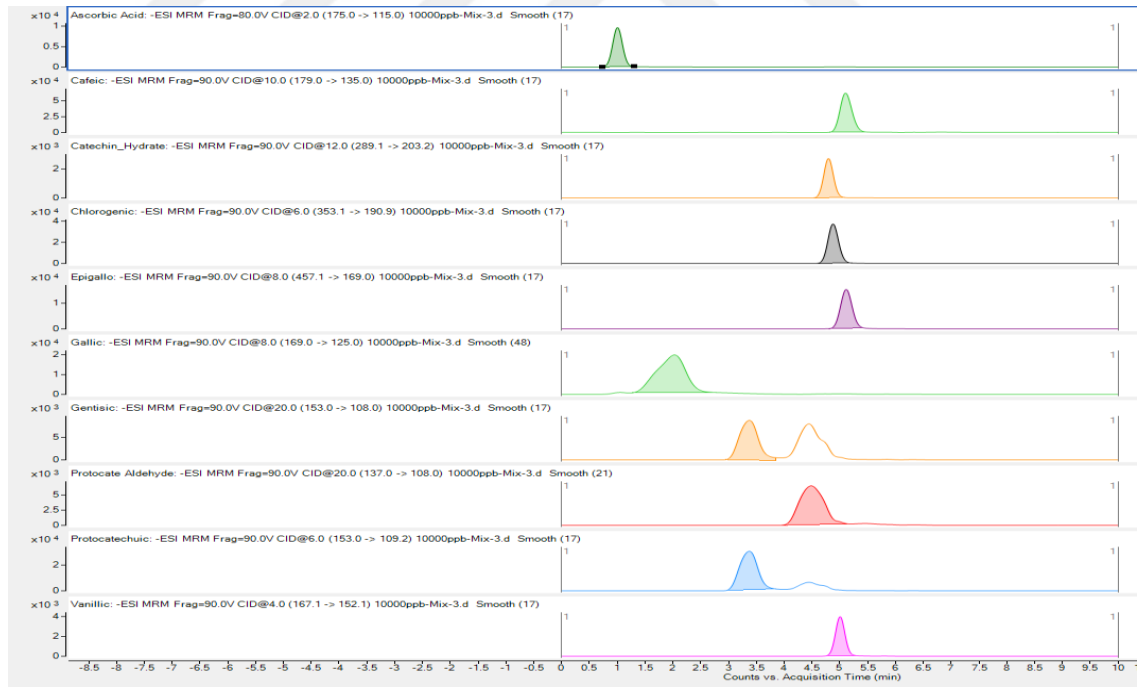
Şekil 4.23: Askorbik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği

4.4.6. LC-MS/MS Metodundaki Standartların Kalibrasyon Grafikleri

19 standart için LC-MS/MS metoduna ait toplu kromatogramlar Şekil 4.24'te, tekli kromatogramlar Şekil 4.25'te gösterilmiştir. Bitki ekstraktları için elde edilen kromatogramlara örnek olarak hava kurusu *Amaranthus retroflexus* L (ARH) örneğinin SE etanol:su (1:1, v/v) çözücüsünde elde edilen ekstraktına ait kromatogram aşağıdaki Şekil 4.26'da verilmiş, diğer tüm kromatogramlar Ek Şekil 37-75'te gösterilmiştir.

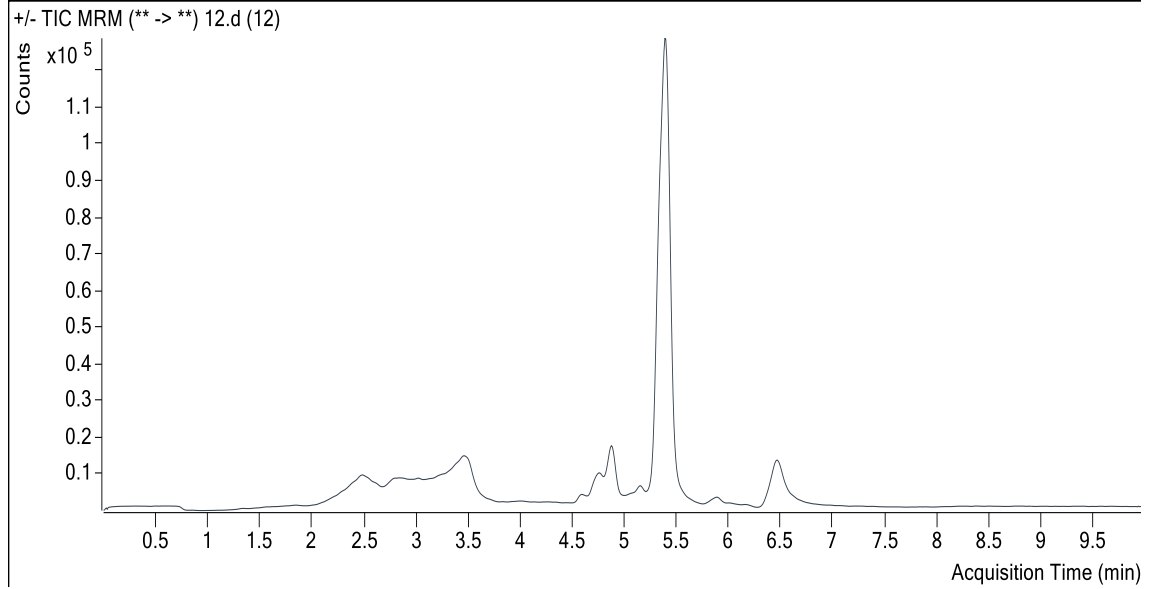
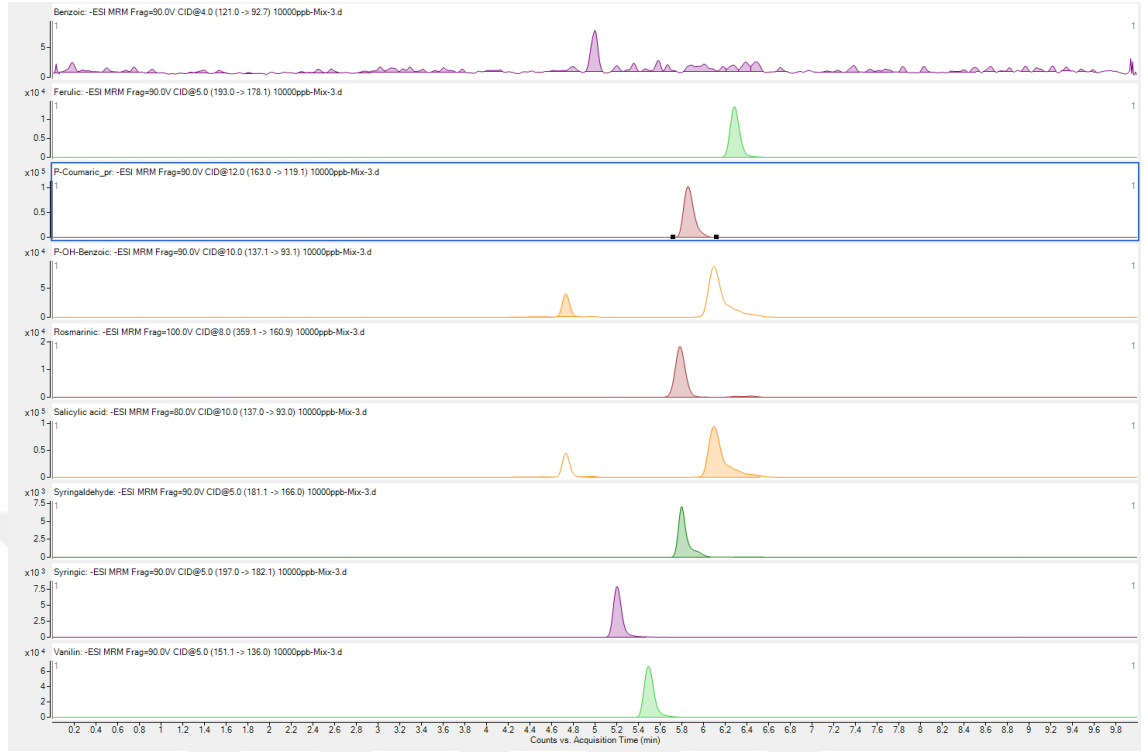


Şekil 4.24: 10000 ppb konsantrasyondaki 19 standardın LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin toplu kromatogramları



Şekil 4.25: 10000 ppb konsantrasyondaki 19 standardın LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin tekli kromatogramları

Şekil 4.25'in devamı



Şekil 4.26: ARH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS kromatogramı

4.4.7. Bitki Ekstraktlarının Fitokimyasal İçeriklerinin LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi

Tüm bitki numunelerinden (parçacık boyutu<125 µm) SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstraktların fitokimyasal madde içerikleri kalitatif ve kantitatif olarak validasyon çalışmaları yapılan metoda göre LC-MS/MS cihazında belirlendi.

4.4.7.1. *Amaranthus retroflexus* L. (AR) Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi

Hava kurusu ve liyofilizatörde kurutulmuş AR bitkisinden elde edilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarının LC-MS/MS metodu ile belirlenen fitokimyasal madde içerik sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10: *Amaranthus retroflexus* L.(AR) bitkisinin çeşitli ekstraktlarının LC- MS/MS ile kantitatif analizi.

Fitokimyasallar numaralarla belirtilmiştir 1: Askorbik asit, 2: Gallik asit, 3: Protokatekuik asit, 4: Protokatekaldehit, 5: Gentisik asit, 6: Kateşin hidrat, 7: Klorojenik asit, 8: Vanilik asit, 9: Kafeik asit, 10: Epigallokateşin galat, 11: Siringik asit, 12: Vanilin, 13: Siringaldehit, 14: *p*-Kumarik asit, 15: Rozmarinik asit, 16: *p*-hidroksi benzoik asit, 17: Salisilik asit, 18: Benzoik asit, 19: Ferulik asit. Fitokimyasalların konsantrasyon birimi: µg/100g kuru bitki numune.

Analit	ARH				ARL			
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)
1	-	-	-	22,24±1,12	-	-	-	8,71±0,61
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	66,43±2,26 ^a	55,54±2,79 ^b	46,56±1,5 ^c 8	9,96±0,48 ^d	96,28±3,67 ^a	81,48±0,84 ^b	51,46±1,82 ^c	13,32±0,55 ^d
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	80,05±2,50 ^b	86,70±2,88 ^a	62,02±0,65 ^c	13,31±0,39 ^d	105,70±2,44 ^a	97,22±2,32 ^b	77,98±1,66 ^c	16,68±0,79 ^d
6	1,30±0,04 ^b	163,52±15,98 ^a	1,16±0,04 ^b	0,093±0,003 ^b	2,68±0,01 ^a	1,16±0,01 ^b	0,19±0,01 ^c	0,037±0,003 ^d
7	196,98±5,44 ^b	605,88±17,79 ^c	1674,08±3,99 ^a	-	74,28±2,42 ^c	521,82±23,54 ^b	874,92±9,54 ^a	-
8	-	145,02±5,82	-	133,95±5,45	-	55,9±2,44	-	237,26±8,18
9	-	1762,40±49,91 ^a	444,10±5,18 ^b	130,27±7,45 ^c	-	15,58±0,41 ^c	874,92±9,54 ^a	28,16±0,78 ^b
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	7,43±0,28 ^c	315±9,34 ^a	111,32±1,74 ^b	13,10±0,25 ^c	11,80±0,58 ^c	189,94±6,76 ^a	84,64±2,41 ^b	14,86±0,49 ^c
13	9,63±0,65 ^c	99,02±2,47 ^a	22,82±0,37 ^b	8,06±0,44 ^d	8,65±0,67 ^c	126,56±4,65 ^a	24,26±0,64 ^b	7,34±0,47 ^c
14	150,55±3,52 ^b	317.80±13,81 ^a	55,24±2,36 ^c	47,48±1,44 ^c	75,05±1,43 ^b	417,72±18,93 ^a	26,76±0,84 ^c	19,82±0,56 ^c
15	0,175±0,004 ^c	3,72±0,03 ^b	34,2±0,90 ^a	0,40±0,01 ^c	1,14±0,01 ^b	0,7±0,001 ^c	1,28±0,01 ^a	0,64±0,03 ^d
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	27,94±1,73	-	-	-	37,22±2,17	-	-
18	619,43±8,53 ^c	2847,32±39,21 ^a	696,24±5,73 ^b	671,11±6,80 ^{bc}	470,95 ^d	1932,42±40,33 ^a	868,18±12,73 ^b	624,58±4,14 ^c
19	-	20,90±0,67	-	-	-	-	-	-

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). -: Tespit edilemedi.

SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1) ASE etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş.

ARH numunesi ekstraktlarının LC-MS/MS ile 19 adet fitokimyasal madde açısından analiz sonuçları değerlendirildiğinde, protokatekuik asit, gentisik asit, klorojenik asit, kafeik asit, vanilin ve siringaldehit miktarları bakımından tüm ekstraksiyon yöntemleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Benzoik asit için UDE E:S(1:1) ile ASE E:S(1:1) ekstraktları arasında ve SE E ile UDE E:S(1:1) ekstraktları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). SE E:S (1:1) ekstraktı ile diğer ekstraktlar arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Kateşin hidrat için SE E, UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu üç ekstrakt ile SE E:S (1:1) ekstraktı arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). *p*-Kumarik asit için UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1), SE E ekstraktı arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Rozmarinik asit için SE E ve ASE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilen değerler arasında anlamlı bir fark tespit edilememişken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) ekstraktları arasında önemli bir fark olduğu belirlendi ($p<0,05$). Bununla birlikte vanilik asit SE E:S (1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında, askorbik asit sadece ASE E:S (1:1) ekstraktında, salisilik asit ve ferulik asit ise sadece SE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Ayrıca gallik asit, protokatekaldehit, epigallokateşin gallat, Siringik asit, *p*-hidroksi benzoik asit gerçekleştirilen ekstraksiyon tekniklerinden elde edilen ekstraktlarda tespit edilememiştir.

ARL numunesi ekstraktlarının LC-MS/MS ile 19 adet fitokimyasal madde açısından kalitatif ve kantitatif analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; protokatekuik asit, gentisik asit, kateşin hidrat, klorojenik asit, kafeik asit, rozmarinik asit, benzoik asit maddelerinin miktarları bakımından tüm ekstraksiyon yöntemleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Vanillin ve siringaldehit için SE E:ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

Bununla birlikte vanilik asit SE E:S (1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında, askorbik asit sadece ASE E:S(1:1) ekstraktıda, salisilik asit ise sadece SE E:S (1:1) estraktına tespit edilmiştir. Ayrıca gallik asit, protokatekaldehit, epigallokateşin gallat, siringik asit, *p*-hidroksi benzoik asit ve ferulik asit gerçekleştirilen ekstraksiyon tekniklerinden elde edilen ekstraktlarda tespit edilememiştir.

4.4.7.2 *Echinops viscosus* DC. subsp. *bithynicus* (Boiss.) Rech f. (EV) Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi

Hava kurusu ve liyofilizatöde kurutulmuş EV bitkisinden elde edilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarının LC-MS/MS metoduyla belirlenen fitokimyasal madde içerik sonuçları Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. bitkisinin çeşitli ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi.

Fitokimyasallar numaralarla belirtilmiştir 1: Askorbik asit, 2: Gallik asit, 3: Protokatekuik asit, 4: Protokatekaldehit, 5: Gentisik asit, 6: Kateşin hidrat, 7: Klorojenik asit, 8: Vanilik asit, 9: Kafeik asit, 10: Epigallokateşin galat, 11: Siringik asit, 12: Vanilin, 13: Siringaldehit, 14: *p*-Kumarik asit, 15: Rozmarinik asit, 16: *p*-hidroksi benzoik asit, 17: Salisilik asit, 18: Benzoik asit, 19: Ferulik asit. Fitokimyasalların konsantrasyon birimi: µg/100g kuru bitki numune

Analit	EVH				EVL			
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)
1	1550,33±40,46 ^a	356,34±11,78 ^b	197,96±3,45 ^c	19,75±0,51 ^d	848,33±23,71 ^a	195,72±4,87 ^b	69,06±1,76 ^c	28,75±0,75 ^d
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	124,88±5,48 ^b	362,76±13,45 ^a	85,22±4,53 ^c	58,67±1,33 ^d	111,18±3,86 ^b	555,76±23,44 ^a	61,94±2,71 ^c	71,22±1,02 ^d
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	109,10±4,65 ^b	138,30±6,43 ^a	144,56±6,11 ^a	20,07±0,43 ^c	102,53±3,31 ^b	97,90±7,42 ^b	120,24±3,24 ^a	20,59±0,58 ^c
6	0,2±0,001 ^c	1,72±0,03 ^a	0,36±0,01 ^b	-	2,1±0,01 ^b	1,30±0,02 ^a	0,29±0,01 ^c	-
7	9911,83±60,65 ^a	5892,48±102,93 ^b	5665,3±50,15 ^c	810,63±11,34 ^d	8817,78±56,82 ^a	5597,98±89,45 ^b	5085,04±45,87 ^c	951,96±9,75 ^d
8	-	39,5±2,55	-	20,54±0,81	-	9,5±0,35	-	1,11±0,05
9	80,55±7,32 ^b	168,72±17,44 ^a	33,06±2,54 ^c	21,36±0,48 ^c	15,33±1,43 ^b	217,42±19,21 ^a	36,36±3,56 ^b	12,26±0,73 ^b
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	21,16±0,97 ^a	7,94±0,81 ^b	4,15±0,02 ^c	-	-	-	-
12	32,10±4,58 ^d	211,68±8,33 ^a	92,3±4,41 ^b	71,37±2,33 ^c	29,65±6,20 ^c	168,42±3,64 ^a	65,9±2,84 ^b	33,15±0,64 ^c
13	29,33±2,55 ^c	225,18±21,54 ^a	50,5±5,26 ^{bc}	59,28±0,08 ^b	10,28±0,89 ^b	173,74±12,38 ^a	24,52±2,76 ^b	17,05±0,68 ^b
14	32,28±2,56 ^b	97,72±2,76 ^a	13,16±0,53 ^d	26,69±1,55 ^c	14,45±1,54 ^b	83,64±3,12 ^a	8,3±0,28 ^c	17,05±0,37 ^b
15	-	-	2,14±0,19	-	0,96±0,02 ^d	2,02±0,03 ^b	1,52±0,11 ^c	3,38±0,03 ^a
16	-	-	-	-	22,78±3,83	-	-	-
17	228,70±16,80 ^b	495,32±40,66 ^a	-	97,34±3,22 ^c	49,95±2,55 ^b	398,54±26,86 ^a	-	22,03±0,66 ^b
18	91,45±5,33 ^c	128,98±4,33 ^b	-	588,63±5,54 ^a	-	-	-	682,57±9,11
19	-	-	-	-	-	-	-	-

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). -: Tespit edilemedi.

SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş; EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş.

EVH numunesinden elde edilen ekstraktların LC-MS/MS ile 19 adet fitokimyasal madde açısından yapılan analiz sonuçlarına bakıldığında, askorbik asit protokatekuik asit, gentisik asit, kateşin hidrat, klorojenik asit, siringik asit, vanilin, *p*-kumarik asit, salisilik asit, benzoik asit miktarları bakımından hepsinin farklı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kafeik asit için UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1), SE E ekstraktları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Siringaldehit için UDE E:S(1:1) ile ASE E:S(1:1) ekstraktlarında ve UDE E:S(1:1) ile SE E ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). SE E:S (1:1) ekstraktı ile diğer ekstraksiyon yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Bununla birlikte vanilik asit SE E:S (1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında, askorbik asit sadece ASE E:S(1:1) ekstraktında, rozmarinik asit ise sadece UDE E:S(1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Ayrıca gallik asit, protokatekaldehit, epigallokateşin gallat, *p*-hidroksi benzoik asit ve ferulik asit bu bitki için elde edilen ekstraktların hiç birinde tespit edilememiştir.

EVL numunesi için elde edilen ekstraktların fitokimyasal madde içeriklerine bakıldığında, askorbik asit, protokatekuik asit, kateşin hidrat, klorojenik asit, vanilin, rozmarinik asit maddelerinin miktarları bakımından tüm ekstraktlar arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Gentisik asit için SE E:S (1:1) ve SE E ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleri arasında anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). *p*-Kumarik asit için SE E ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarından tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile, SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) yöntemleri arasında fark anlamlıdır ($p<0,05$). Kafeik asit ve Siringaldehit için SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu üç ekstrakt ile SE E:S (1:1) ekstraktı arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Salisilik asit için SE E ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) yöntemi arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte vanilik asit SE E:S (1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında, *p*-hidroksi benzoik asit sadece SE E ekstraktında, benzoik asit ise sadece ASE E:S(1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Ayrıca gallik asit, protokatekaldehit, epigallokateşin gallat, siringik asit ve ferulik asit bu numune için gerçekleştirilen ekstraksiyonlardan elde edilen ekstraktların hiçbirinde tespit edilememiştir.

4.4.7.3. *Lathyrus tuberosus* L. (LT) Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi

LT bitkisinin toprak üstü kısımlarının havada (LTH) ve liyofilizatörde kurutulmuş (LTL) (parçacık boyutu $<125\ \mu\text{m}$) numunelerinden elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS metoduyla fitokimyasal madde içerikleri açısından analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.12: *Lathyrus tuberosus* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarının çeşitli ekstraktlarının LC- MS/MS ile kantitatif analizi.

Fitokimyasallar numaralarla belirtilmiştir 1: Askorbik asit, 2: Gallik asit, 3: Protokatekuik asit, 4: Protokatekaldehit, 5: Gentisik asit, 6: Kateşin hidrat, 7: Klorojenik asit, 8: Vanilik asit, 9: Kafeik asit, 10: (-)- Epigallokateşin galat, 11: Siringik asit, 12: Vanilin, 13: Siringaldehit, 14: *p*-Kumarik asit, 15: Rozmarinik asit, 16: *p*-hidroksi benzoik asit, 17: Salisilik asit, 18: Benzoik asit, 19: Ferulik asit. Fitokimyasalların konsantrasyon birimi: µg/100g kuru bitki numune

Analit	LTH				LTL			
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	74,13±4,11 ^b	94,04±4,51 ^a	31,09±3,91 ^c	18,39±0,80 ^d	70,98±3,68 ^a	64,22±2,35 ^b	23,64±2,21 ^c	9,13±0,33 ^d
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	83,35±6,54 ^b	126,32±6,78 ^a	34,56±2,55 ^c	12,67±0,33 ^d	84,48±7,62 ^a	94,56±5,54 ^a	34,89±2,67 ^b	12,62±0,39 ^c
6	1,25±0,05 ^b	1,88±0,30 ^a	0,16±0,01 ^c	-	0,28±0,02 ^a	0,3±0,01 ^a	0,40±0,02 ^b	-
7	711,08±30,46 ^a	253,68±9,88 ^c	521,56±15,46 ^b	102,19±1,39 ^d	180,88±9,10 ^b	114,26±3,72 ^c	299,26±11,43 ^a	14,93±0,76 ^d
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	8,2±0,32	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	46,80±1,44	-	-	1,9±0,06	-	-	-
12	4,7±0,58 ^c	102,72±4,79 ^a	59,52±6,87 ^b	12,82±0,55 ^c	17,38±1,44 ^c	138,36±3,97 ^a	47,50±2,35 ^b	12,41±0,30 ^c
13	3±0,07 ^d	56,30±5,38 ^a	22,24±1,78 ^b	5,36±0,07 ^c	11,3±0,96 ^c	139,10±8,57 ^a	34,2±2,46 ^b	5,84±0,23 ^c
14	184,18±12,56 ^b	453,96±28,95 ^a	51,62±4,66 ^c	63,42±0,95 ^c	128,53±8,45 ^b	400,88±24,18 ^a	46,72±3,83 ^c	30,07±0,56 ^c
15	2,55±0,04 ^d	10,86±0,74 ^c	14,6±0,45 ^b	29,76±2,31 ^a	4,45±0,07 ^b	4,82±0,93 ^b	1,38±0,01 ^c	6,72±0,65 ^a
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	119,18±6,21 ^b	516,42±33,72 ^a	16,20±0,26 ^c	11,09±0,77 ^c	253,03±22,66 ^b	445,84±27,56 ^a	49,28±2,44 ^c	19,82±0,89 ^c
18	80,75±3,74 ^c	466,10±19,63 ^b	-	669,84±15,33 ^a	205,15±10,24 ^c	617,26±21,82 ^b	-	713,70±18,75 ^a
19	-	-	260,08±1,25	-	-	-	-	-

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). -: Tespit edilemedi.

SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş.

LTH numunesinden elde edilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktları üzerinde 19 adet fitokimyasal madde açısından gerçekleştirilen LC-MS/MS analiz sonuçlarına bakıldığında, protokatekuik asit, gentisik asit, kateşin hidrat, klorojenik asit, siringaldehit, *p*-kumarik asit, rozmarinik asit ve benzoik asit miktarları açısından hepsinin istatistiksel manada farklı olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

Vanilin için SE E ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1), UDE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Salisilik asit için UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), SE E:S (1:1), SE E ekstraktları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte kafeik asit ve ferulik asit sadece UDE E:S (1:1) estraktında, siringik asit ise sadece SE E:S (1:1) estraktında tespit edilmiştir. Ayrıca askorbik asit, gallik asit, protokatekaldehit, vanillik asit, epigallokateşin gallat ve *p*-hidroksi benzoik asit bu bitki numunesinden elde edilen hiçbir ekstraktta tespit edilememiştir.

LTL numunesinden elde edilen ekstraktların LC-MS/MS ile 19 adet fitokimyasal madde açısından yapılan analizinde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; protokatekuik asit, klorojenik asit ve benzoik asit miktarları bakımından tüm ekstraktlar arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Gentisik asit, kateşin hidrat ve rozmarinik asit için SE E:S(1:1) ve SE E ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1), UDE E:S(1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Vanilin ve siringaldehit için SE E ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1), UDE E:S(1:1) ekstraktları arasında anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). *p*-Kumarik asit ve salisilik asit için UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarında tespit

edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve SE E yöntemleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte siringik asit sadece SE E ekstraksiyon yönteminde tespit edilmiştir. Ayrıca askorbik asit, gallik asit, protokatekaldehit, vanillik asit, kafeik asit, epigallokateşin gallat, *p*-hidroksi benzoik asit ve ferulik asit hiçbir ekstraktta tespit edilememiştir.

4.4.7.4. *Chenopodium foliosum* Asch. (CF) Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi

Hava kurusu ve liyofilizatörde kurutulmuş CF bitkisi numunelerinden (parçacık boyutu $< 125 \mu\text{m}$) elde edilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktların LC-MS/MS metoduyla fitokimyasal madde içerik analizine ilişkin sonuçları Tablo 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4.13: *Chenopodium foliosum* Asch bitkisinin çeşitli ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi.

Fitokimyasallar numaralarla belirtilmiştir 1: Askorbik asit, 2: Gallik asit, 3: Protokatekuik asit, 4: Protokatekaldehit, 5: Gentisik asit, 6: Kateşin hidrat, 7: Klorojenik asit, 8: Vanilik asit, 9: Kafeik asit, 10: Epigallokateşin galat, 11: Siringik asit, 12: Vanilin, 13: Siringaldehit, 14: *p*-Kumarik asit, 15: Rozmarinik asit, 16: *p*-hidroksi benzoik asit, 17: Salisilik asit, 18: Benzoik asit, 19: Ferulik asit. Fitokimyasalların konsantrasyon birimi: µg/100g kuru bitki numune

Analit	CFH				CFL			
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)
1	535,00±25,12	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	75,35±3,47 ^a	38,90±1,56 ^c	70,10±4,18 ^a	47,64±0,40 ^b	76,80±3,87 ^b	156,40±8,27 ^a	65,96±2,63 ^b	26,00±0,51 ^c
4	-	-	-	10,18±0,80	-	-	-	24,28±0,4
5	83,28±4,67 ^a	50,69±2,25 ^b	83,90±1,55 ^a	42,67±1,2 ^c	87,18±5,53 ^b	207,88±10,66 ^a	93,14±1,78 ^b	38,02±1,8 ^c
6	0,43±0,01 ^c	0,59±0,01 ^b	1,14±0,02 ^a	0,25±0,01 ^d	0,5±0,01 ^b	7,36±0,45 ^a	0,62±0,01 ^b	0,10±0,01 ^c
7	21,73±1,64 ^a	-	16,20±0,76 ^b	3,92±0,08 ^c	68,80±3,22 ^a	1,39±0,08 ^c	0,75±0,04 ^c	35,68 ±0,53 ^b
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	7,73±0,44 ^b	63,30±2,89 ^a	64,78±2,32 ^a	3,92±0,2 ^b	8,10±0,51 ^{bc}	60,24±4,56 ^a	14,36±1,55 ^b	6,00±0,33 ^c
13	0,88±0,02 ^c	14,66±1,55 ^b	48,04±3,68 ^a	1,64±0,10 ^c	3,43±0,22 ^c	10,80±1,85 ^a	7,78±0,56 ^b	1,83±0,27 ^d
14	82,98±5,77 ^a	52,85±2,40 ^c	92,54±4,88 ^b	4,20±0,08 ^d	91,13±3,41 ^c	195,68±7,33 ^a	23,86±2,77 ^b	4,07±0,15 ^d
15	23,23±1,02 ^a	0,27±0,01 ^c	14,73 ±1,30 ^b	-	1,1±0,03 ^a	0,6±0,02 ^b	0,26±0,01 ^c	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	13,07±1,22	-	-	-	-	-	-
18	-	2,28±0,53 ^c	194,26±8,44 ^b	664,64±7,55 ^a	-	-	-	472,20±5,63
19	-	-	6221,44±88,63	-	-	-	-	-

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d) gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). -: Tespit edilemedi.

SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş.

CFH numunesinden elde edilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarının LC-MS/MS ile 19 adet fitokimyasal madde açısından gerçekleştirilen analiz sonuçlarına bakıldığında, kateşin hidrat, klorojenik asit, *p*-kumarik asit, rozmarinik asit ve benzoik asit miktarları arasında anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Protokatekuik asit ve gentisik asit için UDE E:S (1:1) ve SE E ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Vanilin için SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E ve ASE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Siringaldehit için SE E ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte askorbik asit sadece SE E ekstraktında, protokatekaldehit asit sadece ASE E:S (1:1) ekstraktında, salisilik asit sadece SE E:S (1:1) ekstraktında ve ferulik asit ise sadece UDE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Ayrıca gallik asit, vanilik asit, kafeik asit, epigallokateşin gallat, siringik asit ve *p*-hidroksi benzoik asit hiçbir ekstraktta tespit edilememiştir.

CFL numunesinden elde edilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktları üzerinde gerçekleştirilen LC-MS/MS analiz sonuçlarına bakıldığında, tespit edilen siringaldehit, *p*-kumarik asit, rozmarinik asit miktarlarının anlamlı olarak farklı olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

Protokatekuik asit, Gentisik asit ve Kateşin hidrat için SE E ve UDE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Bu iki ekstrakt ile SE E:S(1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Gentisik asit, kateşin hidrat ve rozmarinik asit için SE E:S(1:1) ve SE E ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve UDE E:S(1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Klorojenik asit için SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Ancak, bu iki ekstrakt ile SE E ve ASE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Vanilin için UDE E:S (1:1) ile SE E ekstraktlarında ve SE E ile ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Fakat, SE E:S (1:1) ekstraktı ile diğer ekstraktlar arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Protokatekaldehit ve benzoik asit sadece ASE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Ayrıca askorbik asit, gallik asit, vanillik asit, kafeik asit, epigallokateşin galat, siringik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, salisilik asit ve ferulik asit bu bitki numunesinden elde edilen hiçbir ekstraktta tespit edilememiştir.

4.4.7.5. *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent (CP) Bitkisinin Fitokimyasal İçeriğinin LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi

CP bitkisinin toprak üstü kısımlarının havada (CPH) ve liyofilizatörde (CPL) kurutulmuş (parçacık boyutu $<125\ \mu\text{m}$) numunelerinden elde edilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraktlarının, LC-MS/MS metoduyla fitokimyasal madde analiz sonuçları Tablo 4.14'de verilmiştir.

Tablo 4.14. *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent bitkisinin toprak üstü kısımlarının çeşitli ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi.

Fitokimyasallar numaralarla belirtilmiştir 1: Askorbik asit, 2: Gallik asit, 3: Protokatekuik asit, 4: Protokatekaldehit, 5: Gentisik asit, 6: Kateşin hidrat, 7: Klorojenik asit, 8: Vanilik asit, 9: Kafeik asit, 10: Epigallokateşin galat, 11: Siringik asit, 12: Vanilin, 13: Siringaldehit, 14: *p*-Kumarik asit, 15: Rozmarinik asit, 16: *p*-hidroksi benzoik asit, 17: Salisilik asit, 18: Benzoik asit, 19: Ferulik asit. Fitokimyasalların konsantrasyon birimi: µg/100g kuru bitki numune

Anali t	CPH				CPL			
	SE E	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)	SEE	SE E:S (1:1)	UDE E:S (1:1)	ASE E:S (1:1)
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	160,39±8,36 ^a	203,23±33,21 ^a	173,10±10,73 ^a	69,53±4,56 ^b	109,65±4,26 ^b	199,25±28,77 ^a	107,06±5,33 ^b	32,70±0,74 ^c
4	-	57,45±1,75 ^b	74,28±3,65 ^a	24,69±0,40 ^c	-	60,96±2,23 ^a	56,86±2,68 ^a	21,98±0,54 ^b
5	330,10±15,21 ^a	185,95±6,35 ^b	315,68±8,38 ^a	55,89±0,92 ^c	249,2±11,45 ^b	255,4±10,22 ^{ab}	278,08±14,45 ^a	43,41±0,38 ^c
6	0,25±0,01 ^b	2,15±0,05 ^a	1,06±0,01 ^c	0,43±0,01 ^d	0,45±0,03 ^b	0,88±0,02 ^a	0,21±0,01 ^c	0,2 ±0,02 ^c
7	-	-	1,48±0,84	1,22±0,03	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	513,63±25,44 ^d	3956,50±51,44 ^a	1015,92±23,53 ^b	885,42±14,33 ^c	460,60±20,73 ^c	2825,7±32,66 ^a	885,14±11,54 ^b	147,52±3,22 ^d
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	19,98±1,36 ^c	59,15±1,39 ^a	28,56±3,81 ^b	9,84±0,23 ^d	16,55±1,22 ^c	32,48±2,24 ^a	25,24±2,05 ^b	8,18±0,77 ^d
13	11,10±0,54 ^c	181,35±14,86 ^a	72,26±4,45 ^b	26,90±0,55 ^c	13,80±0,74 ^b	80,20±5,43 ^a	76,96±5,44 ^b	19,15±0,64 ^b
14	118,43±4,58 ^b	601,65±30,38 ^a	47,82±2,98 ^c	55,51±1,34 ^c	63,85±2,45 ^b	668,10±35,45 ^a	33,72±9,61 ^b	27,78±0,54 ^b
15	2,53±0,09 ^a	2,53±0,51 ^a	1,84±0,03 ^b	0,39±0,03 ^c	1±0,04 ^b	1,75±0,43 ^a	0,32±0,05 ^c	0,82±0,01 ^{bc}
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	388,70±27,65	-	579,9±10,22	43,95±1,22 ^c	261,05±19,88 ^b	-	592,77±13,4 ^a
19	-	-	290,34±12,15	-	-	292,00±22,76	-	-

*Aynı satırda farklı harflerle (a,b, c, d) gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). -: Tespit edilemedi.

SE E: Soxhlet ekstraksiyonu etanol çözücüsü, SE E:S (1:1): Soxhlet ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü, UDE E:S (1:1): Ultrasonik destekli ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü ve ASE E:S (1:1): Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu etanol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, liyofilizatörde kurutulmuş; CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.

CPH numunesinden elde edilen tüm ekstraktların, LC-MS/MS ile 19 adet fitokimyasal madde açısından gerçekleştirilen analiz sonuçlarına bakıldığında, protokatekaldehit, kateşin hidrat, kafeik asit ve vanillin miktarları bakımından tüm ekstraktların istatistiksel manada farklı olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Protokatekuik asit için SE E:S (1:1), UDE E:S (1:1) ve SE E ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu üç ekstrakt ile ASE E:S (1:1) ekstraktı arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Gentisik asit için SE E ve UDE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Siringaldehit için SE E ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$).

p-Kumarik asit için UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$), Ancak, bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve SE E yöntemleri arasında anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Rozmarinik asit için SE E:S (1:1) ve SE E ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) yöntemleri arasında anlamlı farklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Klorojenik asit UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında, benzoik asit UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında ve ferulik asit ise sadece UDE E:S (1:1) ekstraktına tespit edilmiştir. Ayrıca askorbik asit, gallik asit, vanillik asit, epigallokateşin gallat, siringik asit, *p*-hidroksi benzoik asit ve salisilik asit u bitki numunesi için elde edilen hiçbir ekstraktta tespit edilememiştir.

CPL numunesinden elde edilen tüm ekstraktlara uygulanan LC-MS/MS analizinden 19 farklı fitokimyasal için elde edilen sonuçlara bakıldığında, kafeik asit, vanilin ve benzoik asit miktarları bakımından tüm ekstraktlar arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Protokatekuik asit için UDE E:S (1:1) ve SE E ekstraktlarından

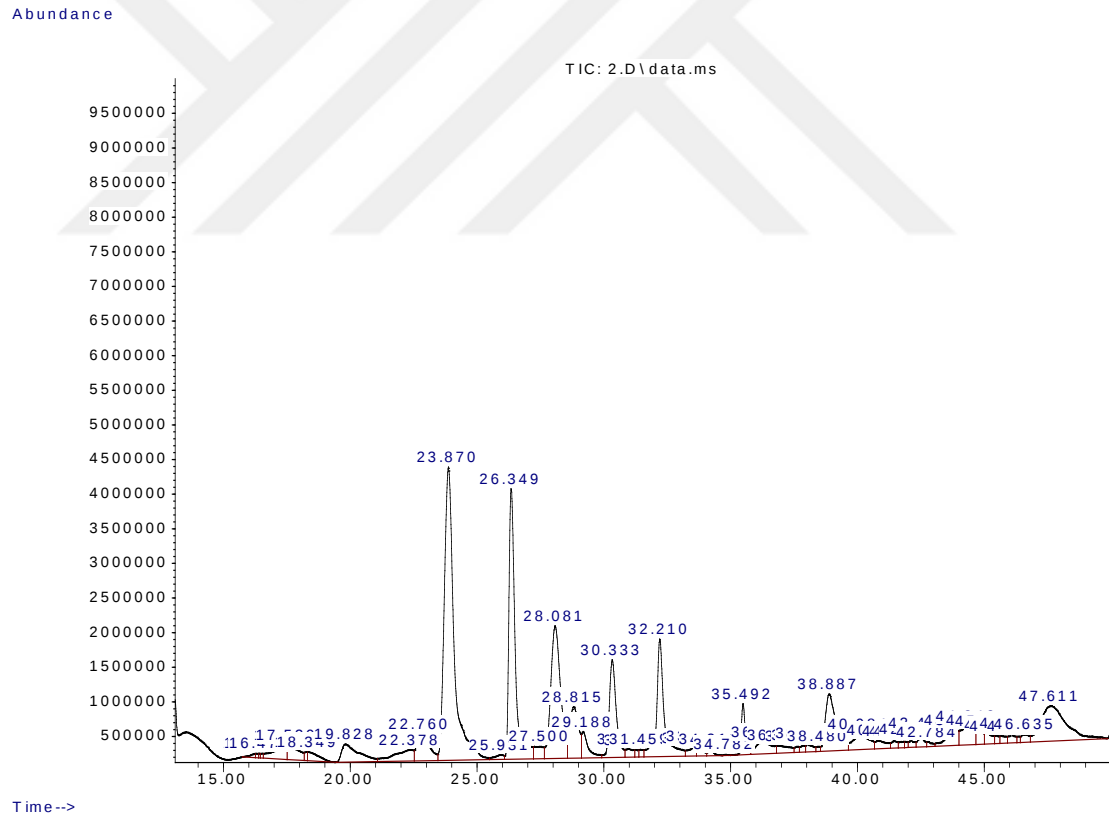
tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Potokatekaldehit için SE E:S (1:1) ve UDE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile ASE E:S (1:1) ekstraktı arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Gentisik asit için UDE E:S (1:1) ile SE E:S (1:1) ekstraktlarında ve SE E:S (1:1) ile SE E ekstraktlarından tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Ancak, ASE E:S (1:1) ekstraksiyon yöntemi ile diğer ekstraksiyon yöntemleri arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Kateşin hidrat için UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarından tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), bu iki ekstrakt ile SE E:S (1:1) ve SE E yöntemleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Protokatekuik asit ve *p*-kumarik asit için UDE E:S (1:1), SE E ve ASE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark yok iken ($p>0,05$), bu üç ekstrakt ile SE E:S (1:1) ekstraktı arasında anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Rozmarinik asit için SE E ile ASE E:S(1:1) ekstraktlarında ve, ASE E:S (1:1) ile UDE E:S (1:1) ekstraktlarında tespit edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaz iken ($p>0,05$), SE E:S (1:1) ekstraktı ile diğer ekstraktlar arasında anlamlı farklar olduğu bulundu ($p<0,05$). Ferulik asit sadece SE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Ayrıca askorbik asit, gallik asit, klorojenik asit, vanillik asit, epigallokateşin gallat, siringik asit, *p*-hidroksi benzoik asit ve salisilik asit hiçbir ekstraktta tespit edilememiştir.

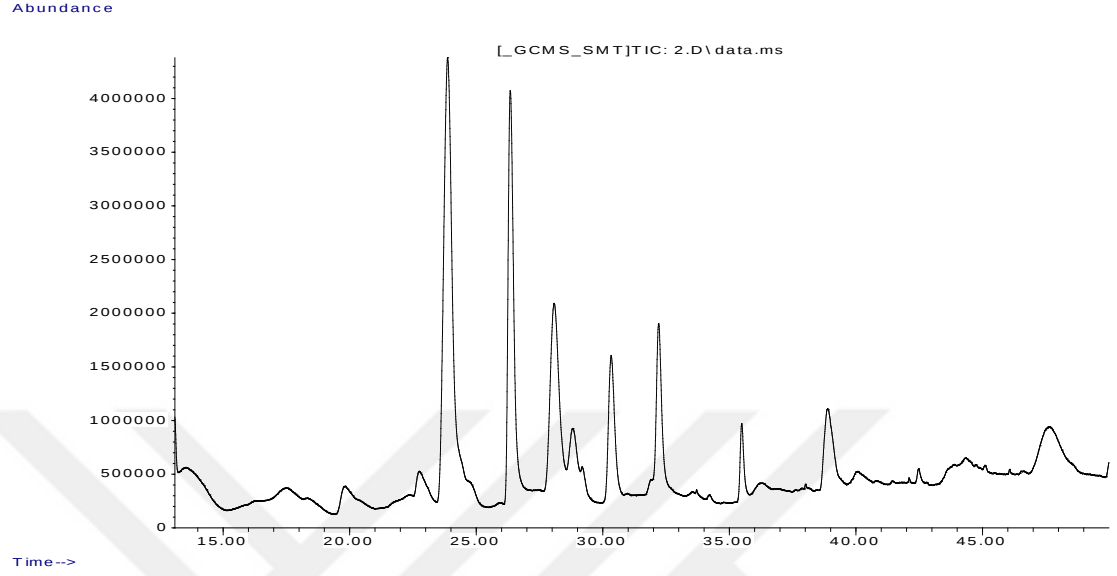
4.5. Bitkilerin Yağ Asidi İçeriklerinin GC-MS ile Analizinden Elde Edilen Sonuçlar

Hava kurusu ve liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin (parçacık boyutu < 125 µm) yağ asidi profilleri, hekzan/izopropanol (3:2) çözücüsünde gerçekleştirilen ekstraksiyondan sonra türevlendirme yapılmak suretiyle elde edilen yağ asidi metil esterlerinin (YAME) GC-MS analiziyle ortaya kondu. YAME analizi yapılan ARH numunesine ait GC-MS kromatogramı Şekil 4.27’de örnek olarak gösterilmiştir. Diğer bitki örnekleri için tüm kromatogramlar ve GC-MS analizinde elde edilen orjinal analiz sonuçlarına ait veriler Ek Şekil 76-85’te gösterilmiştir.

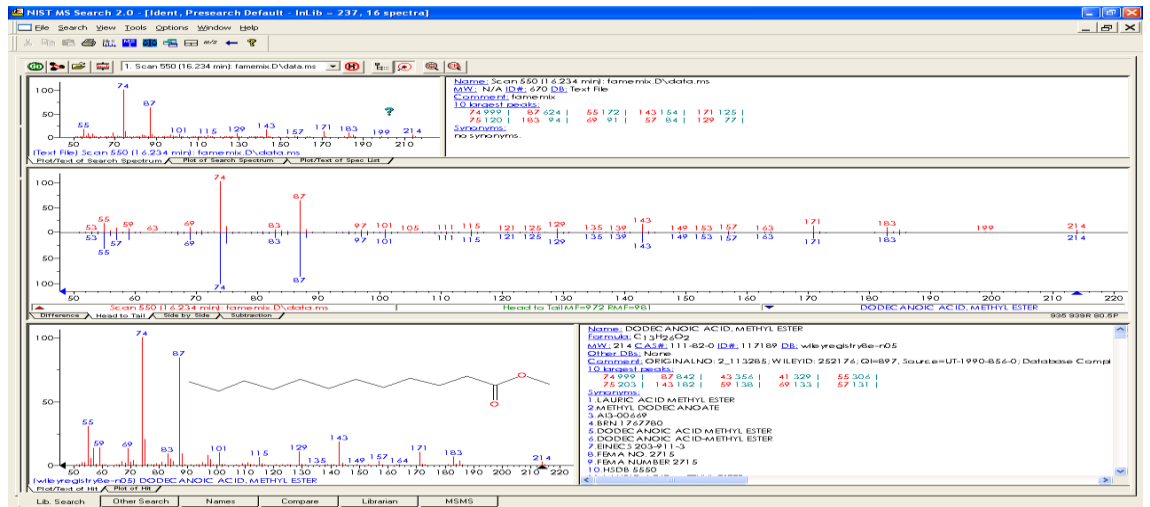


Şekil 4.27: ARH numunesine ait yağ asidi metil esterlerinin GC-MS kromatogramı

Şekil 4.27. Devamı



Bitki numunelerinin YAME'lerinin GC-MS analiz parametreleri Tablo 4.15'te ve yağ asitleri yüzde oranı Tablo 4.16'da gösterilmiştir. YAME'lerin GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumlarına örnek olarak Laurik asit metil esterine ait spektrum Şekil 4.28'de gösterilmiş diğerleri Ek Şekil 86-96'da verilmiştir.



Tablo 4. 15: Yağ asitleri metil esterlerinin GC-MS ile analizinden elde edilen parametreler

No	RT	Yağ asidi metil ester	Moleküler Formül	Moleküler Kütle	Fragment İyonlar
1	16,234	Laurik asit metil ester	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214	55, 57, 69, 74, 75, 87, 129, 143, 171, 183
2	19,736	Miristik asit metil ester	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	55, 57, 69, 74, 75, 87, 143, 199, 211, 242
3	21,738	Pentadekanoik asit metil ester	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	55, 57, 69, 74, 75, 87, 135, 143, 213, 256
4	23,787	Palmitik asit metil ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	55, 57, 69, 74, 75, 83, 87, 143, 227, 270
5	24,863	Palmitoleik asit	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268	55, 69, 74, 81, 83, 84, 87, 96, 97, 98
6	25,898	Margarik asit metil ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	55, 57, 69, 74, 75, 83, 87, 143, 241, 284
7	28,015	Stearik asit metil ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	55, 57, 69, 74, 75, 87, 143, 199, 255, 298
8	28,857	Oleik asit metil ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	55, 67, 69, 74, 83, 84, 87, 96, 97, 98
9	29,463	Linoleik asit metil ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	55, 67, 68, 69, 79, 81, 82, 95, 96, 109
10	31,575	Linolenik asit metil ester	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	55, 67, 79, 80, 81, 91, 93, 94, 95, 107
11	36,392	Behenik asit metil ester	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354	55, 57, 67, 69, 74, 75, 79, 87, 143, 354
12	40,375	Lignocerik asit metil ester	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382	55, 57, 69, 74, 75, 83, 87, 97, 143, 382

Şekil 4.28: Laurik asit metil esterinin (C 12:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu

Tablo 4.16: Bitkilerin yağ asitleri yüzde oranı (toplam yağ asitleri metil esterleri üzerinden)

No	Yağ Asidi	Yağ Asitleri Oranı (%)									
		ARH	ARL	EVH	EVL	LTH	LTL	CFH	CFL	CPH	CPL
1	C12:0	-	-	0,81	3,22	-	-	-	-	-	-
2	C14:0	4,28	3,68	6,53	9,67	2,05	2,26	1,06	1,00	-	2,69
3	C15:0	-	-	-	-	-	-	0,43	0,44	-	-
4	C16:0	41,22	37,00	44,41	42,77	36,84	40,05	17,22	15,67	35,54	36,90
5	C16:1	-	-	-	-	-	-	2,78	2,27	-	-
6	C17:0	0,58	0,72	1,10	0,60	0,14	0,22	-	-	-	-
7	C18:0	18,65	16,67	16,67	16,00	14,68	16,14	5,57	5,19	21,28	8,64
8	C18:1	6,48	8,05	6,53	5,29	2,63	9,23	29,40	32,19	-	-
9	C18:2	9,54	16,11	7,86	7,97	6,24	7,29	32,66	34,66	7,45	7,59
10	C18:3	13,48	13,18	12,90	11,35	33,71	21,77	9,00	7,22	34,72	44,18
11	C22:0	2,37	1,59	3,20	3,13	3,73	3,05	1,88	1,37	1,01	-
12	C24:0	3,40	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-
	DYA	70,50	62,66	72,72	75,39	57,44	61,72	26,16	23,67	57,83	48,23
	TDYA	6,48	8,05	6,53	5,29	2,63	9,23	32,18	34,46	-	-
	ÇDYA	23,02	29,29	20,76	19,32	39,95	29,06	41,66	41,88	42,17	51,77

-: Tespit edilemedi. (C12:0): Laurik asit, (C14:0): Miristik asit, (C15:0): Pentadekanoik asit, (C16:0):Palmitik asit, (C16:1): Palmitoleik asit, (C17:0): Margarik asit, (C18:0): Stearik asit, (C18:1): Oleik asit, (C18:2): Linoleik asit, (C18:3): Linolenik asit, (C22:0): Behenik asit, (C24:0): Lignocerik asit

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş, LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş, CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.

GC-MS analizlerine göre, ARH numunesinde doymuş yağ asidi (DYA) oranı % 70,5 (C14:0: % 4,28; C 16:0: % 41,22; C 17:0: % 0,58; C18:0: % 18,65; C22:0: % 2,37; C24:0: % 3,4), tekli doymamış yağ asidi oranı (TDYA) % 6,48 (C18:1: % 6,48) ve çoklu doymamış yağ asidi oranı (ÇDYA) % 23,02 (C18:2: % 9,54; C18:3: % 13,48) olarak tespit edilmiştir. ARL numunesinde DYA oranı % 62,66 (C14:0: % 3,68; C16:0: % 37,00; C17:0: % 0,58; C18:0: % 16,67; C22:0: % 1,59; C24:0: % 3), TDYA oranı % 8,05 (C18:1: % 8,05) ve ÇDYA oranı % 23,02 (C18:2: % 16,11; C18:3: % 13,18) olarak tespit edilmiştir.

EVH numunesinde DYA oranı % 72,72 (C12:0: % 3,22; C14:0: % 9,67; C16:0: % 42,77; C17:0: % 1,10; C18:0: % 16,67; C22:0: % 3,20), TDYA oranı % 6,53 (C18:1: % 6,53) ve ÇDYA oranı % 23,02 (C18:2: % 7,86; C18:3: % 12,90) olarak tespit edilmiştir. EVL numunesinde DYA oranı % 75,39 (C12:0: % 0,81; C14:0: % 6,53; C16:0: % 44,41; C17:0: % 0,60; C18:0: % 16,00; C22:0: % 3,13), TDYA oranı % 5,29 (C18:1: % 6,53) ve ÇDYA oranı % 19,32 (C18:2: % 7,97; C18:3: % 11,35) olarak tespit edilmiştir. LTH numunesinde DYA oranı % 57,44 (C14:0: % 2,05; C16:0: % 36,84; C17:0: % 0,14; C18:0: % 14,68; C22:0: % 3,73), TDYA oranı % 2,63 (C18:1: % 2,63) ve ÇDYA oranı % 39,95 (C18:2: % 6,24; C18:3: % 33,71) olarak tespit edilmiştir. LTL numunesinde DYA oranı % 61,72 (C14:0: % 2,26; C16:0: % 40,05; C17:0: % 0,22; C18:0: % 16,14; C22:0: % 3,05), TDYA oranı % 9,23 (C18:1: % 9,23) ve ÇDYA oranı % 29,06 (C18:2: % 7,29; C18:3: % 21,77) olarak tespit edilmiştir.

CFH numunesinde DYA oranı % 26,16 (C14:0: % 2,26; C15:0: % 0,43; C16:0: % 17,22; C18:0: % 5,57; C22:0: % 1,37), TDYA oranı % 34,46 (C16:1: % 2,78; C18:1: % 29,40) ve ÇDYA oranı % 41,66 (C18:2: % 32,66; C18:3: % 9,00) olarak tespit edilmiştir. CFL numunesinde DYA oranı % 23,67 (C14:0: % 1,00; C15:0: % 0,44; C16:0: % 15,67; C18:0: % 5,19; C22:0: % 1,37), TDYA oranı % 34,46 (C16:1: % 2,27; C18:1: % 32,19) ve ÇDYA oranı % 41,88 (C18:2: % 34,66; C18:3: % 7,22) olarak tespit edilmiştir. CPH numunesinde DYA oranı % 57,83 (C16:0: % 35,54; C18:0: % 21,28; C22:0: % 1,01), TDYA tespit edilemedi ve ÇDYA oranı % 42,17 (C18:2: % 7,45; C18:3: % 34,72) olarak tespit edilmiştir. CPL numunesinde DYA oranı % 48,23 (C14:0: % 2,69; C16:0: % 36,90; C18:0: % 8,64), TDYA tespit edilemedi ve ÇDYA oranı % 51,77 (C18:2: % 7,59; C18:3: % 44,18) olarak tespit edilmiştir.

4.6. Bitkilerin ICP-MS ile Metal Analizinden Elde Edilen Sonuçlar

Derişik nitrik asitte mikro dalga fırınında yakılan ARH, ARL, EVH, EVL, LTH, LTL, CFH, CFL, CPH ve CPL bitki numunelerinin, ICP MS ile metal analiz sonuçları µg/kg olarak Tablo 4. 17’de gösterilmiştir.

Tabl 4.17: ARH, ARL, EVH, EVL, LTH, LTL, CFH, CFL, CPH ve CPL bitki numunelerinin ICP MS ile metal analiz sonuçları.

Metaller	Bitki numuneleri									
	ARH	ARL	EVH	EVL	LTH	LTL	CFH	CFL	CPH	CPL
⁵¹ V (mg/kg)	0,936± 0,001	0,2521±0,0004	0,27680±0,00003	0,3600±0,0008	0,612±0,007	0,252±0,002	0,444±0,006	0,300±0,005	0,084±0,002	0,084±0,001
⁵² Cr (mg/kg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
⁵⁵ Mn (mg/kg)	8,964±0,016	6,060±0,012	3,648±0,102	7,536±0,013	6,708±0,034	8,112±0,044	6,772±0,041	7,232±0,049	23,004±204	19,540±0,223
⁵⁷ Fe (mg/kg)	38,496±0,033	76,704±0,054	68,004±0,049	12,843±0,080	102,756±0,105	83,472±0,089	288,044±0,376	292,644±0,249	40,361±172	43,056±0,165
⁵⁹ Co (mg/kg)	0,216±0,003	0,0602±0,0004	0,996±0,001	0,084±0,009	0,12080±0,00005	0,360±0,002	0,132±0,0008	0,108±0,001	0,0246±0,0001	0,0244±0,0002
⁶⁰ Ni (mg/kg)	1,824±0,034	0,564±0,001	1,440±0,028	1,656±0,031	0,552±0,002	0,276±0,001	0,444±0,002	0,408±0,004	0,780±0,034	0,552±0,021
⁶³ Cu (mg/kg)	1,632±0,055	2,064±0,067	1,344±0,022	3,204±0,011	3,000±0,026	1,836±0,022	2,484±0,046	2,328±0,065	1,764±0,052	1,708±0,057
⁶⁶ Zn (mg/kg)	13,860±0,165	7,428±0,078	6,060±0,020	5,796±0,012	4,372±0,054	4,296±0,066	6,636±0,077	6,648±0,065	3,288±0,065	2,904±0,043
⁷⁵ As (mg/kg)	0,2164±0,0003	0,1800±0,0002	0,0600±0,0002	0,060±0,0001	0,0840±0,0001	0,0760±0,0004	0,048±0,001	0,04600±0,00004	0,1200±0,0021	0,0124±0,0003
⁸² Se (mg/kg)	0,072±0,001	0,168±0,002	0,096±0,001	0,168±0,002	0,102±0,004	0,108±0,003	0,286±0,012	0,304±0,015	0,2483±0,0005	0,276±0,002
¹⁰⁷ Ag (mg/kg)	0,276±0,001	0,132±0,001	0,516±0,004	0,132±0,001	1,452±0,065	1,204±0,034	0,488±0,032	0,468±0,021	0,072±0,001	0,0964±0,0005
¹¹¹ Cd (mg/kg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
²⁰² Hg (mg/kg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
²⁰⁸ Pb (mg/kg)	1,296±0,044	1,387±0,043	0,360±0,002	0,156±0,001	0,240±0,025	0,216±0,020	0,084±0,002	0,060±0,001	0,0247±0,0001	0,0240±0,0002

-: Tespit edilemedi.

ARH: *Amaranthus retroflexus* L. havada kurutulmuş, EVH: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. havada kurutulmuş, LTH: *Lathyrus tuberosus* L. havada kurutulmuş, CFH: *Chenopodium foliosum* Asch havada kurutulmuş, CPH: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent havada kurutulmuş, ARL: *Amaranthus retroflexus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, EVL: *Echinops viscosus* DC. subsp. *Bithynicus* (Boiss.) Rech. f. liyofilizatörde kurutulmuş, LTL: *Lathyrus tuberosus* L. liyofilizatörde kurutulmuş, CFL: *Chenopodium foliosum* Asch liyofilizatörde kurutulmuş, CPL: *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent liyofilizatörde kurutulmuş.

Bitki numunelerinin metal analizlerine bakıldığında V metali ARH'ta ($0,936 \pm 0,001$ mg/kg) en yüksek, CPH'ta ($0,084 \pm 0,001$ mg/kg) ve CPL'de ($0,084 \pm 0,001$ mg/kg) en düşük miktarda; Mn metali CPH'de ($23,004 \pm 0,204$ mg/kg) en yüksek, EVH'ta ($3,648 \pm 0,102$ mg/kg) en düşük, Fe metali CFL'de ($292,644 \pm 0,249$ mg/kg) en yüksek, ARH'ta ($38,496 \pm 0,033$ mg/kg) en düşük; Co metali LTL'de ($0,360 \pm 0,002$ mg/kg) en yüksek, CPL'de ($38,496 \pm 0,033$ mg/kg) en düşük; Ni metali ARH'ta ($1,824 \pm 0,034$ mg/kg) en yüksek, LTL'de ($0,276 \pm 0,001$ mg/kg) en düşük; Cu metali LTH'de ($3,000 \pm 0,026$ mg/kg) en yüksek, EVH'de ($1,344 \pm 0,022$ mg/kg) en düşük; Zn metali ARH'de ($13,860 \pm 0,165$ mg/kg) en yüksek, CPL'de ($2,904 \pm 0,043$ mg/kg) en düşük; As metali ARH'de ($0,2164 \pm 0,0003$ mg/kg) en yüksek, CPL'de ($0,0124 \pm 0,0003$ mg/kg) en düşük; Se metali CFL'de ($0,3040 \pm 0,015$ mg/kg) en yüksek, ARH'de ($0,072 \pm 0,001$ mg/kg) en düşük; Ag metali LTH'de ($1,452 \pm 0,065$ mg/kg) en yüksek, CPH'de ($0,072 \pm 0,001$ mg/kg) en düşük; Pb metali ARL'de ($1,452 \pm 0,065$ mg/kg) en yüksek, CPL'de ($0,0240 \pm 0,0002$ mg/kg) en düşük değerde olduğu tespit edildi. Ayrıca Cr, Cd ve Hg metalleri bitki numunelerinde tespit edilememiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu doktora tez çalışmasında, Kuzey Anadolu kökenli tüketilebilir. *Amaranthus retroflexus* L., *Echinops viscosus* DC. subsp. *bithynicus* (Boiss.) Rech f., *Lathyrus tuberosus* L., *Chenopodium foliosum* Asch., *Caltha polypetala* Hochst. Ex Lorent bitkilerinin toprak üstü kısımları hem serin ve kuru havada ve hem de liyofilizatörde kurutularak elde edilen numunelerden parçacık boyutu 125 µm'den küçük olan kısımları SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraksiyonlarına tabi tutuldu. Elde edilen ekstraktların her birinin ekstraksiyon verimi, toplam fenolik madde içerikleri ve toplam antioksidan kapasiteleri CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP yöntemleriyle, fenolik bileşik içerikleri ise LC-MS/MS analiziyle belirlendi. Ayrıca tüm bitki numunelerinin toplam antioksidan kapasitelerini doğrudan katı numune üzerinden belirlemek için QUENCHER-CUPRAC, QUENCHER-ABTS, QUENCHER-DPPH ve QUENCHER-FRAP prosedürleri uygulandı. GC-MS analizi ile yağ asidi içerikleri, ICP-MS ile de metal içerikleri analiz edilmiştir.

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'e bakıldığında, ARH, ARL ve LTH numunelerine ait ekstraksiyon verimlerinin en yüksek UDE E:S(1:1) ekstraksiyon işlemiyle elde edildiği görülebilir. Buna karşılık EVH, EVL, LTL, CFL ve CPL numunelerine ait ekstraksiyon verimleri SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) ekstraksiyon işlemlerinde daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Bu son numuneler için SE E:S (1:1) ile UDE E:S(1:1) yöntemlerinden elde edilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). CFH ve CPH numuneleri için ekstraksiyon verimi en yüksek düzeyde SE E:S (1:1) ekstraksiyon işlemiyle elde edildi.

10 numunenin 5'i için (EVH, EVL, LTL, CFL, CPL) çözücü olarak etanol:su (1:1 v/v)'nin kullanıldığı deneylerde, SE ve UDE ekstraksiyon tekniklerinin verimleri arasında oluşan farkın anlamlı olmadığı bulundu ($p>0,05$). Her iki teknik için birbirinden oldukça farklı ekstraksiyon süreleri ve sıcaklık değerleri (SE için yaklaşık 8 saat ve 78-100 °C'de, UDE için 40 dakika ve 25-37 °C'de) kullanılmıştır. Bu gerçek

ışığında, UDE tekniği düşük sıcaklıkta çalışması ve daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi gibi avantajları dolayısıyla ön plana çıktığı söylenebilir (Bernal, 1992; Wang ve Weller, 2006; González Centenove ark., 2015). Çözücüleri farklı olan SE E:S (1:1) ve SE E yöntemleriyle elde edilen ekstraksiyon verimleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, LTH numunesi hariç ($p>0,05$), diğer tüm bitki numunelerinde anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). SE'de çözücü olarak etanol yerine etanol:su (1:1, v/v) kullanılmasıyla çözücünün polaritesinin ve nispeten ekstraksiyon sıcaklığının artması, ekstraksiyon veriminin de artışına neden olmuştur denilebilir (Tepebaş, 2012). Tüm bitki numuneleri için ASE E:S (1:1) ekstraksiyon işleminde elde edilen ekstraksiyon verim değerlerinin, diğer ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen verim değerlerine göre düşük seviyede olduğu da açıkça görülmektedir.

Bitkilerin toplam fenolik madde içeriklerinin (mg GAE/100 g hava kurusu numune olarak) verildiği Tablo 4.2'de ve Şekil 4.3'e bakıldığında; ARH, CPH, CPL ve LTL numuneleri için en yüksek toplam fenolik madde içeriğinin UDE E:S(1:1) ekstraksiyon işleminde tespit edildiği görülebilmektedir. Bu yöntemlerden elde edilen ortalamalar diğer ekstraksiyon tekniklerinden elde edilenlerden istatistiksel anlamda farklıdır ($p<0,05$). LTH ve ARL numuneleri için en yüksek toplam fenolik madde içeriği SE E:S (1:1) ve UDE E:S(1:1) ekstraksiyon işlemlerinde elde edildi. Bu yöntemlerin kendi aralarında anlamlı bir fark tespit edilmez iken ($p>0,05$), bu iki teknik ile diğer SE E ve ASE E:S(1:1) teknikleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p<0,05$). EVH numunesi için elde edilen ortalama toplam fenolik madde içerikleri, ASE E:S(1:1) ve SE E:S (1:1) ekstraksiyon işlemleri için anlamlı bir fark ortaya koymadı ($p>0,05$). Ancak bu iki teknikten elde edilen ortalamalar ile SE E ve UDE E:S(1:1) tekniklerinden elde edilenler arasında anlamlı farklar olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

CFL numunesinde uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen toplam fenolik madde ortalamaları arasında istatistiksel olarak bir fark olup olmadığına bakıldığında, SE E:S (1:1) ile SE E ($357,58\pm5,51$) yöntemlerinden elde edilen ortalamalar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca SE E ile UDE E:S(1:1) ($300,15\pm34,81$)

yöntemleri arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). ASE E:S (1:1) yönteminden elde edilen ortalamanın diğer tekniklerden farklı ve en küçük değer olduğu bulundu ($p<0,05$). Çalışılan tüm bitki numunelerine uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ortalama toplam fenolik madde içeriği sıralamaları Tablo 5.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 5.1: Bitki numunelerine uygulanan ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen ortalama toplam fenolik madde sıralaması

Numuneler	Ekstraksiyonlardan elde edilen ortalama toplam fenolik madde miktarı sıralaması
ARH	UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)
EVH	ASE E:S (1:1) ^a =SE E:S (1:1) ^a >UDE E:S(1:1)> SE E
LTH	SE E:S (1:1) ^a =UDE E:S(1:1) ^a >SE E>ASE E:S (1:1)
CFH	SE E:S (1:1)>UDE E:S(1:1) ^a > SE E >ASE E:S (1:1)
CPH	UDE E:S(1:1)>ASE E:S (1:1)>SE E:S (1:1) ^a =SE E ^a
ARL	UDE E:S(1:1) ^a =SE E:S (1:1) ^a >ASE E:S (1:1) ^a =SE E ^a
EVL	SE E:S(1:1)>ASE E:S (1:1)> UDE E:S (1:1) >SE E
LTL	UDE E:S(1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)>SE E:S (1:1)
CFL	SE E:S(1:1) ^a =SE E ^{ab} >SE E ^{ab} =UDE E:S (1:1) ^b >ASE E:S (1:1)
CPL	UDE E:S(1:1)>ASE E:S (1:1)>SE E:S (1:1) ^a =SE E ^a

*Aynı satırda aynı harflerle (a,b) gösterilen değerler arasında istatistiksel bir fark yoktur($p>0,05$).

Tablo 5.1’e bakıldığında, UDE E:S (1:1) ve SE E:S (1:1) ekstraksiyonlarının genelde yüksek ve birbirlerine yakın miktarlarda toplam fenolik madde değerleri sergiledikleri görülmektedir. Bu durum, bitkisel numunelerden fenolik maddelerin ekstraksiyonunda UDE’nin yüksek verimli, enerji ve çözücü gereksiniminin az olması ve dolayısıyla ekonomik olması, daha kısa bir zaman diliminde yapılabilmesi, ultrasonik dalgaının meydana getirdiği sıcaklık artışının düşük olması nedeniyle hedef bileşenlerin bozunmadanekstrakte edilebilmesi, böylelikle bitkisel numunelerden termal olarak karasız olan analitlerin ekstraksiyonunda kullanılabilmesi gibi avantajları dikkate alındığında, SE gibi geleneksel yöntemlere göre iyi bir alternatif ekstraksiyon tekniği olarak karşımıza çıkmaktadır (Cavuldak ve ark.,2016; Herrera ve De Castro, 2005; Huang ve ark., 2009; Ma, ve ark 2009). Genel olarak UDE E:S(1:1) ve SE E:S (1:1)’den

elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları yüksek olduğu için bu ekstraktlara ait antioksidan aktivitenin de yüksek olması beklenebilir. Literatürde yer alan bazı çalışmalarda, ekstraktlarda veya numunelerdeki toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivite arasında doğrusal bir ilişki bulunduğu belirtilmektedir (Alasalvar, 2005; Tawaha, 2007).

Tablo 5.1'e bakıldığında, genel olarak çalışılan bitki numuneleri için en düşük ekstraksiyon verimlerini ortaya koyan yöntemin ASE E:S (1:1) olduğu görülmektedir (Tablo 4.1). Ancak buna rağmen, EVH numunesinde UDE E:S(1:1) ve SE E yöntemlerinden, EVL numunesinde UDE E:S (1:1) ve SE E yöntemlerinden, LTL numunesinde SE E:S (1:1) yönteminden, CPH ve CPL numunelerinde ise SE E:S (1:1) ve SE E yöntemlerinden daha yüksek toplam fenolik madde içeriği sergilemiştir. Bu durum ASE ekstraksiyon tekniğinin toplam fenolik madde içeriği belirlenmesinde seçici olduğunu düşündürmektedir. (Barros ve ark. 2013).

Çözücüleri farklı olan SE E:S (1:1) ve SE E yöntemleriyle elde edilen toplam fenolik madde içerikleri karşılaştırıldığında, ARH, EVH, LTH, CFH, ARL ve EVL numunelerinde SE E:S (1:1) ekstraksiyonunun SE E ekstraksiyonundan anlamlı olarak daha yüksek değerler sergilediği tespit edilmiştir ($p<0,05$). CPH, CFL ve CPL numunelerinde SE E:S (1:1) ve SE E ekstraksiyonları arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sadece LTL numunesinde SE E ekstraktı SE E:S (1:1) ekstraktından anlamlı olarak daha yüksek toplam fenolik madde sergilemiştir ($p<0,05$). Bu sonuçlar, SE'de çözücü olarak etanol yerine etanol:su (1:1, v/v) kullanılmasıyla çözücünün polaritesinde ve göreceli olarak ekstraksiyon sıcaklığında meydana gelen artışın ekstrakte edilebilen toplam fenolik madde içeriği üzerine olumlu yönde etkisi olacağını bildiren bazı çalışmaların sonuçlarıyla uyum içindedir (Alara, ve ark. 2018).

Bitki numunelerinin tüm ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen ekstraktlarına uygulanan CUPRAC yönteminden elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan bitki numunelerinin toplam antioksidan kapasitelerini doğrudan katı numunelerden belirleyebilmek için uygulanan QUENCHER-CUPRAC yönteminden elde edilen sonuçlar da bu tabloda verilmiştir. QUENCHER-CUPRAC yöntemi için çözücü literatürde de belirtildiği gibi etanol:su (1:1, v/v) olarak seçildi (Tufan ve ark., 2013; Tufan, 2012) ve reaksiyon süresinin optimize edilmesi için tüm bitki numunelerine uygulandı.

QUENCHER-CUPRAC yöntemiyle antioksidan aktivite tayini deneylerinden elde edilen Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'daki sonuçlardan, reaksiyonun tamamlanması için 40 dakika reaksiyon süresinin yeterli olduğu tespit edilmiştir. Bitki numunelerine uygulanan SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemlerinden elde edilen CUPRAC toplam antioksidan aktivite değerleri ile katı numuneye doğrudan uygulanan QUENCHER-CUPRAC yönteminden elde edilen değerler karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla sıralanarak aşağıdaki Tablo 5.2'de verilmiştir.

Tablo 5.2: Bitki numunelerinin CUPRAC ve QUENCHER-CUPRAC yöntemlerinden elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin mmol TE/kg kuru bitki türünden sıralaması

Numuneler	Toplam antioksidan kapasiteleri sıralaması
ARH	QUENCHER-CUPRAC ^a =UDE E:S(1:1)>UDE E:S(1:1) ^{ab} =SE E:S (1:1) ^b >SE E>ASE E:S (1:1)
EVH	QUENCHER-CUPRAC> UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1) > SE E >ASE E:S (1:1)
LTH	UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1) > QUENCHER-CUPRAC> SE E >ASE E:S (1:1)
CFH	QUENCHER-CUPRAC ^a =SE E:S ^a (1:1)>UDE E:S(1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
CPH	QUENCHER-CUPRAC ^a =UDE E:S(1:1)>SE E:S (1:1) ^b >SE E>ASE E:S (1:1)
ARL	QUENCHER-CUPRAC ^a =SE E:S (1:1) ^a > UDE E:S(1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
EVL	QUENCHER-CUPRAC> UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1) > SE E >ASE E:S (1:1)
LTL	UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1) > QUENCHER-CUPRAC> SE E >ASE E:S (1:1)
CFL	QUENCHER-CUPRAC ^a =SE E ^{ab} > SE E ^{ab} =UDE E:S(1:1) ^b > SE E:S (1:1) >ASE E:S (1:1)
CPL	QUENCHER-CUPRAC ^a =SE E:S (1:1) ^a >UDE E:S(1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)

*Aynı satırda aynı harflerle (a,b) gösterilen değerler arasındafark yoktur (p>0,05).

Tablo 5.2'ye bakıldığında ARH, EVH, CFH, CPH, ARL, EVL, CFL ve CPL numunelerine uygulanan QUENCHER-CUPRAC işlemiyle elde edilen toplam antioksidan kapasite değerlerin en yüksek olduğu görülmektedir. LTH ve LTL numuneleri için UDE E:S (1:1) ekstraktlarının CUPRAC değerleri en yüksek seviyede bulundu. Tüm bitki numuneleri için ASE E:S(1:1)'den elde edilen ekstraktların CUPRAC toplam antioksidan kapasite değerlerinin en düşük düzeyde olduğu görülmektedir.

QUENCHER-CUPRAC yöntemi, çalışmada gerçekleştirilen geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre daha yüksek sonuçların elde edildiği veya bazı hallerde de çok yakın toplam antioksidan kapasite değerleri sergilediği bir yöntem olarak göze çarpmaktadır. Bu durumu literatürde gerçekleştirilen çalışmalar da desteklemektedir (Tufan, 2012; Tufan ve ark., 2013). Ayrıca QUENCHER işleminin CUPRAC yöntemine uygulanması ile yöntemin daha güvenilir ve hassas bir şekilde toplam antioksidan kapasite değeri ortaya koyması sağlanmaktadır. Yine uzun ekstraksiyon işlemleri gerektirmemesi ve işlemlerin düşük sıcaklıklarda etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi ile hedef moleküllerin bozunmamasının sağlanması, QUENCHER işleminin önemli avantajları arasında sayılabilir (Gökmen ve ark., 2009; Tufan ve ark., 2013; Tufan, 2012).

Bitki numunelerinden elde edilen tüm ekstraktlara uygulanan ABTS yönteminden elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan bitki numunelerinin toplam antioksidan kapasitelerini doğrudan katı numunelerden belirleyebilmek için uygulanan QUENCHER-ABTS yönteminden elde edilen sonuçlar da bu tabloda yer almaktadır. QUENCHER-ABTS yöntemi için çözücü olarak literatüre uygun olarak etanol:su (1:1, v/v) seçilmiş (Serpén ve ark., 2012a; Serpén ve ark., 2012b) ve reaksiyon süresinin optimize edilmesi için tüm bitki numunelerinde kullanılmıştır.

Şekil 4.10 ve 4.11'den yararlanarak elde edilen verilerden, QUENCHER-ABTS prosedürünün tamamlanması için 30 dakika reaksiyon süresinin yeterli olduğu anlaşılmıştır. Bitki numunelerinin QUENCHER-ABTS yöntemi ve diğer orijinal yöntemlerden elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla elde edilen Tablo 4.5 aşağıda verilmiştir.

Tablo 5.3: Bitki numunelerinin ABTS ve QUENCHER-ABTS yöntemlerinden elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin mmol TE/kg kuru bitki türünden sıralaması

Numuneler	Toplam antioksidan kapasitelerisıralaması
ARH	QUENCHER-ABTS ^a =UDE E:S(1:1) ^a >SE E:S (1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)
EVH	QUENCHER-ABTS> UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1) > SE E >ASE E:S (1:1)
LTH	UDE E:S(1:1)>SE E:S (1:1) > QUENCHER-ABTS> SE E >ASE E:S (1:1)
CFH	QUENCHER-ABTS>SE E:S (1:1)>UDE E:S(1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
CPH	QUENCHER-ABTS>UDE E:S(1:1)>SE E:S (1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)
ARL	QUENCHER-ABTS>UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1)>SE E >ASE E:S (1:1)
EVL	QUENCHER-ABTS>SE E:S (1:1)>UDE E:S(1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
LTL	UDE E:S(1:1)>SE E:S (1:1)>QUENCHER-ABTS> SE E >ASE E:S (1:1)
CFL	QUENCHER-ABTS ^a =UDE E:S(1:1) ^a >SE E:S (1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
CPL	QUENCHER-ABTS>UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1)>SE E >ASE E:S (1:1)

* Aynı satırda aynı harflerle (a,b) gösterilen değerler arasında fark yoktur(p>0,05).

Tablo 5.3'e bakıldığında, en yüksek toplam antioksidan aktivite değerlerinin ARH, EVH, CFH, CPH, ARL, EVL, CFL ve CPL numunelerine uygulanan QUENCHER-ABTS işlemiyle elde edilenler olduğu tespit edilmiştir. LTH ve LTL numuneleri için UDE E:S(1:1) ekstraktlarının ABTS toplam antioksidan kapasite değerleri en yüksek düzeyde bulundu. Tüm numuneler için ASE E:S(1:1)'den elde edilen ekstraktların toplam antioksidan kapasite değerleri en düşük seviyelerde tespit edildi.

QUENCHER-ABTS yönteminden elde edilen değerlerin, SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1)ekstraktlarına uygulanan orijinal ABTS yönteminden elde edilenlerden dahayüksek veya bazı durumlarda çok yakın oldukları gözlenmiştir. Bu durum, QUENCHER-ABTS yöntemi toplam antioksidan kapasite belirleme işleminin,

ekstraktlara uygulanan orijinal yöntemlerden, daha kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, işlem basamaklarının az oluşu gibi literatürde ifade edilen avantajlı yönleri itibarıyla ayrılmasını sağlamaktadır (Serpén ve ark., 2007; Serpén ve ark., 2008a; Serpén ve ark., 2008b; Açar ve ark., 2009; Serpén ve Gökmen, 2009; Serpén ve ark., 2012a; Serpén ve ark., 2012b).

Çalışmada kullanılan bitki numuneleri üzerinde gerçekleştirilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen ekstraktlara DPPH yöntemi uygulanarak elde edilen DPPH toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir. Ayrıca katı numunelere doğrudan uygulanabilen QUENCHER-DPPH yönteminden elde edilen sonuçlar da bu tabloda ifade edilmiştir. QUENCHER-DPPH yönteminde reaksiyon süresinin optimize edilmesi için çözücü olarak literatürde belirtildiği gibi etanol:su (1:1, v/v) karışımı seçildi ve tüm bitki numunelerine uygulandı (Serpén ve ark., 2012a; Serpén ve ark., 2012b).

Şekil 4.15 ve 4.16'dan da görülebileceği üzere, QUENCHER-DPPH işlemi için 50 dakika reaksiyon süresinin yeterli olduğu tespit edilmiştir. Bitki numunelerine doğrudan uygulanan QUENCHER-DPPH toplam antioksidan kapasite yönteminden ve ekstraktlara uygulanan orijinal DPPH yönteminden elde edilen değerler büyükten küçüğe doğru sıralanıp aşağıdaki Tablo 5.4'te verilmiştir.

Tablo 5.4: Bitki numunelerinin DPPH ve QUENCHER-DPPH yöntemlerinden elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin mmol TE/kg kuru bitki türünden sıralaması

Numuneler	Toplam antioksidan kapasiteleri sıralaması
ARH	QUENCHER-DPPH>UDE E:S(1:1)>SE E:S (1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)
EVH	QUENCHER-DPPH> UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1) > SE E >ASE E:S (1:1)
LTH	QUENCHER-DPPH>UDE E:S(1:1) ^a =SE E:S (1:1) ^a >SE E ^b =ASE E:S (1:1) ^b
CFH	QUENCHER-DPPH>SE E:S (1:1)>UDE E:S(1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
CPH	QUENCHER-DPPH>UDE E:S(1:1)>SE E:S (1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)
ARL	QUENCHER-DPPH>UDE E:S(1:1) ^a =SE E:S (1:1) ^a >SE E>ASE E:S (1:1)
EVL	QUENCHER-DPPH>SE E:S (1:1)>UDE E:S(1:1)>SE E >ASE E:S (1:1)
LTL	QUENCHER-DPPH>UDE E:S(1:1)>SE E:S (1:1) >SE E ^a =ASE E:S (1:1) ^a
CFL	QUENCHER-DPPH ^a =SE E:S (1:1) ^a >UDE E:S(1:1)>SE E ^b =ASE E:S (1:1) ^b
CPL	QUENCHER-DPPH>UDE E:S(1:1)>SE E:S (1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)

*Aynı satırda aynı harflerle (a,b) gösterilen değerler arasında fark yoktur(p>0,05).

Tablo 5.4'e bakıldığında tüm bitki numuneleri için uygulanan QUENCHER-DPPH işlemiyle elde edilen toplam antioksidan kapasite değerlerinin en yüksek değerler olduğu görülmektedir. ASE E:S(1:1) ekstraktlarından DPPH yöntemiyle elde edilen toplam antioksidan kapasite değerlerinin ise tüm bitki numuneleri için en düşük değerler olduğu göze çarpmaktadır.

QUENCHER-DPPH yönteminden elde edilen ortalama toplam antioksidan kapasite değerleri, CUPRAC ve ABTS yöntemlerinden elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Pratikliği ve sunduğu diğer avantajlarla beraber değerlendirildiğinde QUENCHER işleminin literatürde de belirtildiği gibi önemli bir antioksidan kapasite tayin uygulaması olduğu söylenebilir. Buraya kadar elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle de uyum içindedir (Gökmen ve ark.,2009; Serpen ve ark., 2012b; Tufan, 2012; Tufan ve ark., 2013).

Çalışmada kullanılan tüm bitki numunelerinden SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleriyle elde edilen ekstraktlara FRAP yönteminin uygulanmasıyla elde edilentoplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan bitki numunelerinin toplam antioksidan kapasitelerini doğrudan

katı numuneler üzerinden belirleyebilmek için uygulanan QUENCHER-FRAP yönteminden elde edilen sonuçlar da bu tabloda yer almaktadır. QUENCHER-FRAP yöntemi için çözücü seçiminde, diğer yöntemler ile aynı olması için etanol:su (1:1, v/v) karışımı tercih edildi ve reaksiyon süresinin optimizasyonu için tüm bitki numunelerinde kullanıldı.

QUENCHER-FRAP yönteminin reaksiyon süre optimizasyonu için Şekil 4.20 ve 4.21'deki verilerden yararlanılarak reaksiyonun tamamlanması için 40 dakika sürenin yeterli olacağına karar verildi. Bitki numunelerinin toplam antioksidan kapasitelerinin büyükten küçüğe doğru sıralanması için hem QUENCHER-FRAP yönteminden hem de orijinal FRAP yönteminden elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilerek aşağıdaki Tablo 5.5'te verilmiştir.

Tablo 5.5: Bitki numunelerinin FRAP ve QUENCHER-FRAP yöntemlerinden elde edilen toplam antioksidan kapasitelerinin mmol TE/kg kuru bitki türünden sıralaması

Numuneler	Toplam antioksidan kapasiteleri sıralaması
ARH	QUENCHER-FRAP>UDE E:S(1:1) ^a =SE E:S (1:1) ^a >SE E>ASE E:S (1:1)
EVH	QUENCHER-FRAP>SE E:S (1:1) >UDE E:S(1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
LTH	QUENCHER-FRAP>SE E:S (1:1) ^a =UDE E:S(1:1) ^a > SE E >ASE E:S (1:1)
CFH	QUENCHER-FRAP > UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
CPH	QUENCHER-FRAP > SE E:S (1:1)> UDE E:S(1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)
ARL	QUENCHER-FRAP > SE E:S (1:1)> UDE E:S(1:1)>SE E>ASE E:S (1:1)
EVL	QUENCHER- FRAP >SE E:S (1:1)>UDE E:S(1:1)>SE E >ASE E:S (1:1)
LTL	QUENCHER-FRAP > UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
CFL	QUENCHER-FRAP > UDE E:S(1:1)> SE E:S (1:1)> SE E >ASE E:S (1:1)
CPL	QUENCHER- FRAP >SE E:S (1:1)>UDE E:S(1:1)>SE E >ASE E:S (1:1)

*Aynı satırda aynı harflerle (a,b) gösterilen değerler arasında fark yoktur(p>0,05).

Tablo 5.5'e bakıldığında QUENCHER-FRAP işlemiyle elde edilen toplam antioksidan kapasite değerlerinin en yüksek değerler olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar literatürde yapılan bazı çalışmalar tarafından da desteklenmektedir (Serpen ve

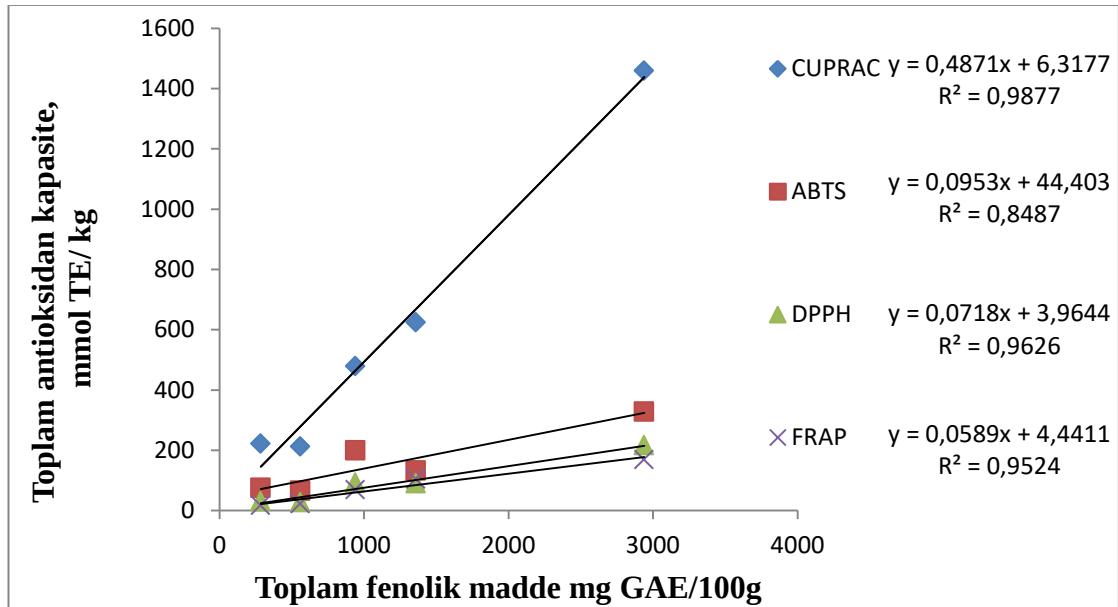
ark.,2012a; Serpen ve ark., 2012b). Tüm bitki numuneleri için ASE E:S(1:1) yönteminden elde edilen ekstraktların FRAP toplam antioksidan kapasite değerlerinin en düşük olduğu yine aynı tablodan görülebilmektedir.

QUENCHER-FRAP yönteminden elde edilen değerler çalışmada gerçekleştirilen SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraksiyon yöntemlerine uygulanan FRAP yönteminden daha yüksek değerler olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar literatürde yapılan bazı çalışmalar tarafından da desteklenmektedir (Serpen ve ark., 2012a; Serpen ve ark. 2012b; Lu ve ark., 2016).

Doğrudan etkileşime dayalı QUENCHER işleminde uygulanan CUPRAC, ABTS⁺, DPPH ve FRAP yöntemleri vasıtasıyla belirlenen değerler, bitkilerin ekstraktlarından aynı yöntemlerle elde edilen değerlerden daha yüksek veya yakın olduğu literatürde yapılan çeşitli çalışmalarla da desteklenmiştir (Açar, 2009; Serpen ve ark., 2007; Gökmen 2009; Tufan ve ark., 2013; Lu ve ark., 2016, Serpen ve ark., 2012a; Serpen ve ark., 2012b).

Ekstraktlardan elde edilen toplam antioksidan kapasite ile QUENCHERprosedürü ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri arasındaki anlamlı farklılıkların esas olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinin verimliliği ile birlikte oksidasyon ve başka bazı etkenlerle kolaylıkla bozulan hassas antioksidan moleküllerin miktarının azalmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ekstraksiyon temelli işlemlerin en zayıf noktası, numunelerdeki çözünmeyen antioksidan bileşenlerin dikkate alınamamalarıdır. Birçok gıdada ekstraksiyon ile çözünmeyen, matrikse bağlı halde kalan antioksidanlar bulunmaktadır (Gökmen ve ark., 2009). Bu tür numunelerin de antioksidan aktivitelerini belirlemek için QUENCHER prosedürü önemli bir araç olarak kullanılabilir.

Toplam fenolik madde ile toplam antioksidan kapasite arasında bulunan ilişkinin değerlendirilmesinde, bu konu hakkında çalışma yapan araştırmacıların bir grubu toplam fenolik madde içeriği ile toplam antioksidan kapasite arasında doğru orantılı bir bağıntının olduğunu belirtmektedir (Tawaha ve ark., 2007; Alasalvar ve ark., 2005). Diğer araştırma grubu toplam fenolik madde ile toplam antioksidan kapasite değişkenleri arasında bir bağıntının olmadığını veya bu bağıntının daha karmaşık olduğunu ileri sürmektedirler (Khamsah ve ark., 2006; Muchuweti ve ark., 2006). Bu bağıntıyı belirleyebilmek için yapılan çalışmada havada ve liyofilizatörde kurutulmuş bitki numunelerinin SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP yöntemleri ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafiği çizildi ve örnek olarak havada kurutulmuş numunelerin UDE E:S (1:1) ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi Şekil 5.1’de gösterildi. Diğer grafikler Ek Şekil 97-103’te verildi ve korelasyon kat sayıları belirlenerek Tablo 5.6’da gösterilmiştir.



Şekil 5.1: Havada kurutulmuş numunelerin UDE E:S (1:1) ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.

Tablo 5.6: Havada ve liyofilizatörde kurutulmuş bitki numunelerinin SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S(1:1) ve ASE E:S(1:1) ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP yöntemleri ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafiklerinden elde edilen korelasyon (R^2) kat sayıları.

Kurutma işlemi	Ekstraksiyon işlemi	Toplam Fenolik Madde- CUPRAC	Toplam Fenolik Madde - ABTS	Toplam Fenolik Madde - DPPH	Toplam Fenolik Madde - FRAP
Havada kurutulmuş	SE E:S (1:1)	0,508	0,470	0,718	0,718
	SE E	0,988	0,945	0,777	0,944
	UDE E:S (1:1)	0,987	0,743	0,889	0,986
	ASE E:S (1:1)	0,938	0,964	0,913	0,835
Liyofilizatörde kurutulmuş	SE E:S (1:1)	0,354	0,431	0,751	0,493
	SE E	0,938	0,916	0,886	0,950
	UDE E:S (1:1)	0,985	0,743	0,889	0,986
	ASE E:S (1:1)	0,966	0,962	0,987	0,787

Tablo 5.6'ya bakıldığında havada kurutulmuş numunelerin SE E:S (1:1) ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı CUPRAC, ABTS ve liyofilizatörde kurutulmuş bitki numunelerinin SE E:S (1:1) ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı CUPRAC, ABTS ve FRAP yöntemleri ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafiklerinden elde edilen korelasyon (R^2) kat sayılarının(0,354-0,508) oldukça düşük elde edildiğinden doğrusal bir ilişkinin olduğunu söylemek zordur (Khamsah ve ark., 2006; Muchuweti ve ark., 2006).

Diğer taraftan havada ve liyofilizatörde kurutulmuş bitki numunelerinin SE E, UDE E:S (1:1) ve ASE E:S (1:1) ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP yöntemleri ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafiklerinden elde edilen korelasyon (R^2) kat sayıları (0,733-0,988) doğrusal bir ilişki içinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca havada kurutulmuş bitki numunelerinin SE E:S (1:1) ekstraksiyon

yöntemlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı DPPH ve FRAP yöntemleri ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafiklerinden elde edilen korelasyon (R^2) kat sayıları (0,718) ve liyofilizatörde kurutulmuş bitki numunelerinin SE E:S (1:1) ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı DPPH yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafiklerinden elde edilen korelasyon (R^2) kat sayısının (0,751) doğrusal bir ilişki içinde olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile genel olarak toplam fenolik madde miktarındaki artışın antioksidan aktiviteyi olumlu olarak etkilediği görüşü ön plana çıkmaktadır (Tawaha ve ark., 2007; Alasalvar ve ark., 2005).

Çalışmada bitkilerin toprak üstü kısımlarından SE E:S (1:1), SE E, UDE E:S (1:1) ve ASE E:S(1:1) yöntemleriyle elde edilen ekstraktlarının 19 adet fitokimyasal (fenolik asit:13 adet; fenolik aldehit:3 adet; flavanol: 2 adet; vitamin: 1 adet) açısından kalitatif ve kantitatif analizlerini gerçekleştirmek üzere metod validasyonu yapılarak LC-MS/MS tekniği kullanıldı.

ARH numunesi için tüm ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları değerlendirildiğinde ($\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru bitki olarak); Askorbik asit ($22,24 \pm 1,12$) sadece ASE E:S(1:1) ekstraktında, protokatekuik asit ($66,43 \pm 2,26$) en yüksek SE E ekstraktında tespit edilmişken, gentisik asit ($86,70 \pm 2,88$), kateşin hidrat ($163,52 \pm 15,98$), vanilik asit ($145,02 \pm 5,82$) kafeik asit ($1762,40 \pm 49,91$), vanilin ($315 \pm 9,34$), siringaldehit ($99,02 \pm 2,47$), *p*-kumarik asit ($317.80 \pm 13,81$), benzoik asit ($2847,32 \pm 39,21$) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında bulunmuştur. Salisilik asit($27,94 \pm 1,73$) ve ferulik asit ($20,90 \pm 0,67$) sadece SE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Klorojenik asit ($1674,08 \pm 3,99$) ve rozmarinik asit ($34,2 \pm 0,90$) en yüksek değerlerini UDE E:S (1:1) ekstraktında ortaya koymuşlardır. Gallik asit, protokatekaldehit, epigallokateşingallat, siringik asit ve *p*-hidroksi benzoik asit mevcut ekstraktlarda tespit edilememiştir.

ARL numunesi için tüm ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları değerlendirildiğinde ($\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru bitki türünden); Askorbik asit ($8,71 \pm 0,61$) sadece ASE E:S(1:1)

ekstraktında; protokatekuik asit ($96,28 \pm 3,67$), gentisik asit ($105,70 \pm 2,44$), kateşin hidrat ($2,68 \pm 0,01$) en yüksek SE E ekstraktında; klorojenik asit ($874,92 \pm 9,54$), kafeik asit ($874,92 \pm 9,54$) verozmarinik asit ($1,28 \pm 0,01$) en yüksek UDE E:S(1:1) ekstraktında; vanilik asit ($237,26 \pm 8,18$) en yüksek ASE E:S(1:1) ekstraktında; vanilin ($189,94 \pm 6,76$), siringaldehit ($126,56 \pm 4,65$), *p*-kumarik asit ($417,72 \pm 18,93$) ve benzoik asit ($1932,42 \pm 40,33$) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Salisilik asit ($27,94 \pm 1,73$) sadece SE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Gallik asit, protokatekaldehit, epigallokateşingallat, siringik asit, *p*-hidroksi benzoik asit ve ferülik asit bu bitkiden elde edilen ekstraktlarda tespit edilememiştir.

EVH numunesi için tüm ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları $\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru bitki türünden değerlendirildiğinde; Askorbik asit ($1550,33 \pm 40,46$) ve klorojenik asit ($9911,83 \pm 60,65$) en yüksek SE E ekstraktında; protokatekuik asit ($124,88 \pm 5,48$), kateşin hidrat ($1,72 \pm 0,03$), vanilik asit ($39,5 \pm 2,55$), kafeik asit ($168,72 \pm 17,44$), siringik asit ($21,16 \pm 0,97$), vanilin ($211,68 \pm 8,33$), siringaldehit ($225,18 \pm 21,54$), *p*-kumarik asit ($97,72 \pm 2,76$) ve salisilik asit ($495,32 \pm 40,66$) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında; benzoik asit ($1932,42 \pm 40,33$) en yüksek ASE E:S(1:1) ekstraktında; gentisik asit ($138,30 \pm 6,43$) en yüksek UDEE:S(1:1) ekstraktında; rozmarinik asit ($2,14 \pm 0,19$) sadece UDE E:S(1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Gallik asit, protokatekaldehit, epigallokateşin gallat, *p*-hidroksi benzoik asit ve ferülik asit mevcut ekstraktlarda tespit edilememiştir.

EVL numunesi ekstraktlarının LC-MS/MS analiz sonuçları $\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru bitki türünden değerlendirildiğinde; Askorbik asit ($848,33 \pm 23,71$) ve klorojenik asit ($8817,78 \pm 56,82$) en yüksek SE E ekstraktında; *p*-hidroksi benzoik asit sadece SE E ekstraktında; protokatekuik asit ($555,76 \pm 23,44$), kateşin hidrat ($1,30 \pm 0,02$), vanilik asit ($9,5 \pm 0,35$), kafeik asit ($217,42 \pm 19,21$), vanilin ($168,42 \pm 3,64$), siringaldehit ($173,74 \pm 12,38$), *p*-kumarik asit ($83,64 \pm 3,12$), salisilik asit ($398,54 \pm 26,86$) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında; benzoik asit ($682,57 \pm 9,11$) en yüksek ASE E:S(1:1) ekstraktında; rozmarinik asit ($3,38 \pm 0,03$) sadece ASE E:S (1:1) ekstraktında ve gentisik asit

(120,24±3,24) en yüksek UDE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Gallik asit, protokatekaldehit, epigallokateşin gallat, sirinik asit ve ferulik asit ekstraktlarda tespit edilememiştir.

LTH numunesi için tüm ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları µg/100g kuru bitki türünden değerlendirildiğinde; protokatekuik asit (94,04±4,51), gentisik asit (126,32±6,78), kateşin hidrat (1,88±0,30), vanilin (102,72±4,79), sirinaldehit (56,30±5,38), *p*-kumarik asit (453,96±28,95) ve salisilik asit (516,42±33,72) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında; sirinik asit (46,80±1,44) sadece SE E:S (1:1) ekstraktında; klorojenik asit (711,08±30,46) en yüksek SE E ekstraktında; rozmarinik asit (29,76±2,31) ve benzoik asit (669,84±15,33) en yüksek ASE E:S (1:1) ekstraktında; kafeik asit (8,2±0,32) ve ferulik asit (260,08±1,25) sadece UDE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Askorbik asit, gallik asit, protokatekaldehit, vanilik asit, epigallokateşin galat ve *p*-hidroksi benzoik asit mevcut ekstraktlarda tespit edilememiştir.

LTL numunesi için tüm ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları değerlendirildiğinde (µg/100g kuru bitki türünden); protokatekuik asit (70,98±3,68) sadece SE E:S ekstraktında; gentisik asit (94,56±5,54), kateşin hidrat (0,3±0,01), vanilin (138,36±3,97), sirinaldehit (139,10±8,57), *p*-kumarik asit (400,88±24,18) ve salisilik asit (445,84±27,56) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında; klorojenik asit (299,26±11,43) en yüksek UDE E:S (1:1) ekstraktında; rozmarinik asit (6,72±0,65) ve benzoik asit (713,70±18,75) en yüksek ASE E:S (1:1) ekstraktında; sirinik asit (1,9±0,06) sadece SE E ekstraktında tespit edilmiştir. Askorbik asit, gallik asit, protokatekaldehit, vanilik asit, kafeik asit, epigallokateşingallat, *p*-hidroksi benzoik asit ve ferulik asit bu bitki ekstraktlarında tespit edilememiştir.

CFH numunesi için tüm ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları değerlendirildiğinde (µg/100g kuru bitki türünden); askorbik asit (535±25,12) sadece SE E ekstraktında;

protokatekuik asit ($75,35 \pm 3,47$), gentisik asit ($83,28 \pm 4,67$), klorojenik asit ($21,73 \pm 1,64$), *p*-kumarik asit ($21,73 \pm 1,64$) ve rozmarinik asit ($23,23 \pm 1,02$) en yüksek SE E ekstraktında; vanilin ($63,30 \pm 2,89$) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında; salisilik asit ($13,07 \pm 1,22$) sadece SE E:S (1:1) ekstraktında; kateşin hidrat ($1,14 \pm 0,02$) ve siringaldehit ($48,04 \pm 3,68$) en yüksek UDE E:S (1:1) ekstraktında; ferülik asit ($6221,44 \pm 88,63$) sadece UDE E:S (1:1) ekstraktında; benzoik asit ($713,70 \pm 18,75$) en yüksek ASE E:S (1:1) ekstraktında; protokatekaldehit ($10,18 \pm 0,80$) sadece ASE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Gallik asit, vanilik asit, kafeik asit, epigallokateşin gallat, siringik asit ve *p*-hidroksi benzoik asit bu bitkiden elde edilen ekstraktlarda tespit edilememiştir.

CFL numunesi için tüm ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları $\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru bitki türünden değerlendirildiğinde; protokatekuik asit ($156,40 \pm 8,27$), gentisik asit ($207,88 \pm 10,66$), kateşin hidrat ($7,36 \pm 0,45$), vanilin ($60,24 \pm 4,56$), siringaldehit ($10,80 \pm 1,85$) ve *p*-kumarik asit ($195,68 \pm 7,33$) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında; klorojenik asit ($68,80 \pm 3,22$) ve rozmarinik asit ($1,1 \pm 0,03$) en yüksek SE E ekstraktında; benzoik asit ($713,70 \pm 18,75$) ve protokatekaldehit ($10,18 \pm 0,80$) sadece ASE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Askorbik asit, gallik asit, vanilik asit, kafeik asit, epigallokateşin gallat, siringik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, salisilik asit ve ferülik asit bu bitki ekstraktlarında tespit edilememiştir.

CPH numunesi için tüm ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları $\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru bitki türünden değerlendirildiğinde; protokatekuik asit ($203,23 \pm 33,21$), kateşin hidrat ($2,15 \pm 0,05$), kafeik asit ($3956,50 \pm 51,44$), vanilin ($59,15 \pm 1,39$), siringaldehit ($181,35 \pm 14,86$), *p*-kumarik asit ($601,65 \pm 30,38$) ve rozmarinik asit ($2,53 \pm 0,51$) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında; gentisik asit ($330,10 \pm 15,21$) ve rozmarinik asit ($2,53 \pm 0,09$) en yüksek SE E ekstraktında; protokatekaldehit ($74,28 \pm 3,65$) ve klorojenik asit ($1,48 \pm 0,84$) en yüksek UDE E:S (1:1) ekstraktında; ferülik asit ($290,34 \pm 12,15$) sadece UDE E:S (1:1) ekstraktında; benzoik asit ($579,9 \pm 10,22$) sadece ASE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Askorbik asit, gallik asit, vanilik asit, epigallokateşin

gallat, sirینگik asit, p-hidroksi benzoik asit ve salisilik asit bu bitki ekstraktlarında tespit edilememiştir.

CPL numunesi için tüm ekstraktların LC-MS/MS analiz sonuçları $\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru bitki türünden değerlendirildiğinde; protokatekuik asit ($199,25 \pm 28,77$), protokatekaldehit ($60,96 \pm 2,23$), kateşin hidrat ($0,88 \pm 0,02$), kafeik asit ($2825,7 \pm 32,66$), vanilin ($32,48 \pm 2,24$), sirینگaldehit ($80,20 \pm 5,43$), p-kumarik asit ($668,10 \pm 35,45$) ve rozmarinik asit ($1,75 \pm 0,43$) en yüksek SE E:S (1:1) ekstraktında; ferulik asit ($292 \pm 22,76$) sadece SE E:S(1:1) ekstraktında; gentisik asit ($278,08 \pm 14,45$) en yüksek UDE E:S (1:1) ekstraktında; benzoik asit ($592,77 \pm 13,4$) sadece ASE E:S (1:1) ekstraktında tespit edilmiştir. Askorbik asit, gallik asit, klorojenik asit vanilik asit, epigallo kateşingallat, sirینگik asit, p-hidroksi benzoik asit ve salisilik asit mevcut ekstraktlarda tespit edilememiştir.

Çalışılan bitkilerden SE, UDE ve ASE yöntemleriyle elde edilen ekstraktların içeriğindeki 19 adet fitokimyasalın LC MS/MS tekniğı ile analizi ile ilgili literatürde yapılan araştırma neticesinde herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların literatüre önemli katkılar sağlayarak, çalışılan bitkiler için gelecekte yapılacak farklı çalışmalara yol göstereceğı düşünölmektedir.

Çalışılan bitki numunelerinin GC-MS analizi ile yağ asitleri profilleri de belirlenmiştir. DYA oranı en yüksek olan EVL numunesi iken (% 75,39) en düşük CFL numunesi(% 23,67) olarak tespit edilmiştir. TDYA oranı en yüksek olan CFL numunesi iken (% 34,46), CPH numunesinde ise tekli doymamış yağ asidi tespit edilememiştir. ÇDYA oranı en yüksek olan CPL numunesi iken (% 51,77) en düşük olanın ise EVL numunesi olduğı (% 19,32) bulundu.

C12:0 (Laurik asit) sadece EVH ve EVL numunelerinde tespit edilebilmiş iken, C14:0 (Miristik asit) en yüksek EVL numunesinde, C15:0 (Pentadekanoik asit) sadece CFH ve CFL numunelerinde, C16:0 (Palmitik asit) en yüksek EVH numunesinde gözlenmiştir. C16:1 (Palmitoleik asit) sadece CFH ve CFL numunelerinde tespit edilebilmiş, buna mukabil C17:0 (Margarik asit) en yüksek EVH numunesinde, C18:0 (Stearik asit) en yüksek CPH numunesinde elde edilmiştir. C18:1 (Oleik asit) ve C18:2 (Linoleik asit) en yüksek CFL numunesinde, C18:3 (Linolenik asit) en yüksek CPL numunesinde, C22:0 (Behenik asit) en yüksek LTH numunesinde bulunmuşken, C24:0 (Lignoserik asit) ise sadece ARH ve ARL numunelerinde tespit edile bilmiştir.

Çalışılan bitki numunelerinin ICP-MS ile V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Hg ve Pb metalleri açısından içerik analizleri gerçekleştirilmiştir. Tablo 2.5'te bitkiler için ulusal sağlık örgütünün önerdiği sınır değerler As için 5 mg/kg, Pb için 10 mg/kg, Cd için 0,3 mg/kg, Cr için 2 mg/kg olarak belirtilmiştir (WHO, 2007). Çalışılan bitki numunelerin As, Pb, Cd ve Cr metal içeriklerine baktığımızda (Tablo 4.17) literatürde belirtilen değerlerden daha düşük olduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abdille, M. H., Singh, R. P., Jayaprakasha, G. K. and Jena, B. S. (2005). Antioxidant activityof the extracts from Dillenia indica fruits. Food Chemistry, 90, 891-896.
- Açar, Ö. Ç., Gökmen, V., Pellegrini, N. and Fogliano, V. (2009). Direct evaluation of the total antioxidant capacity of raw and roasted pulses, nuts and seeds. European Food Research and Technology, 229(6), 961–969.
- Agilent Technologies, (2001). 7500 ICP-MS ChemstationandInstrument Training, Course Number: H8974A, Student Manual.
- Akay Diri, H., (2006). *Salvia candidissima Vahl*. Uçucu Bileşenlerinin Karekterizasyonu ve Antioksidant Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mugla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Akkuş, İ. (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, No 38, Sağlık dizisi 5, Konya.
- Aksakal, Ö. ve Kaya, Y. (2008). Erzurum ve çevresinde halk tarafından gıda amaçlı olarak kullanılan bitkiler. 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum, Türkiye, 10, 1009-1012.
- Akyüz, E. (2007). *Polygonum bistorta ssp. carneum* Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Alara, O. R., Abdurahman, N. H. and Ukaegbu, C. I. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11, 12-17.
- Alasalvar, C., Al-Farsi, M., and Shahidi, F. (2005). Compositional characteristics and antioxidant components of cherry laurel varieties and pekmez. *Journal of food science*, 70(1), 47-52.
- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A. and Mafra, L. I., (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, 149, 151- 158.
- Alho, H. and Leinonen, J. (1999). [1] Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 3–15.
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221(4617), 1256–1264.
- Anilanmert, B., Çavuş, F., Narin, I., Cengiz, S., Sertler, Ş., Özdemir, A. A. ve Açikkol, M. (2016). Simultaneous analysis method for GHB, ketamine, norketamine, phenobarbital, thiopental, zolpidem, zopiclone and phenytoin in urine, using C18 poroshell column. *Journal of Chromatography B*, 1022, 230–241.
- AOAC Method 963.15, (1990). Association of Official Analytical Chemists, USA.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion

reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7970-7981.

Arslan Burnaz, N. (2007). *Viburnum opulus* ve *V. Orientale* Bitki Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75(2), 199–212.

Aruoma, O. I. and Cuppett, S. L. (1997). Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. The American Oil Chemists Society Press, Illinois: Champaign., 241.

Ávila, V., Bertolotti, S. G., Criado, S., Pappano, N., Debattista, N., García, N. A., (2001). Antioxidant Properties of Natural Flavonoids: Quenching and Generation of Singlet Molecular Oxygen. International Journal of Food Science & Technology, 36 (1), 25–3.

Aydın, F. (2008). Birlikte Çöktürme ve Katı Faz Özütlemesi ile Bazı Ağır Metal İyonlarının Zenginleştirilmeleri. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Kayseri.

Banerjee, A. K., Mandal, A., Chanda, D., and Chakraborti, S. (2003). Molecular and Cellular Biochemistry, 253(1/2), 307–312.

- Banerjee, S. K. and Bonde, C. G. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(5), 817-822.
- Banni, S. (2002). Conjugated linoleic acid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 13(3), 261-266.
- Barros, F., Dykes, L., Awika, J. M., and Rooney, L. W. (2013). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 305–312.
- Baydar, N. G., Özkan, G. and Sağdıç, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15(5), 335-339.
- Benthin, B., Danz, H. and Hamburger, M. (1999). Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 837(1-2), 211-219.
- Benzie I. F. F. and Strain, J. J., (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, *Methods in enzymology*. Academic Press, 299, 15-27.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

- Bernal, J.L., Delnozal, M.J., Jimenez, J.J. (1992). Use of a High-Pressure Soxhlet Extractor for the Determination of Organochlorine Residues by Gas-Chromatography. *Chromatographia*, 34(9-10), 468.
- Bijlsma, L., Beltrán, E., Boix, C., Sancho, J. V. and Hernández, F. (2014). Improvements in analytical methodology for the determination of frequently consumed illicit drugs in urban wastewater. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(17), 4261-4272.
- Bilaloğlu, G. V. and Harmandar, M. (1999). *Flavonoidler*, Bakanlar Matbaacılık Ltd.Şti, İstanbul, 336-343.
- Bjorklund, E., Bowadt, S., Nilsson, T. and Mathiasson, L. (1999). Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 285.
- Borbalán, Á. M. A., Zorro, L., Guillén, D. A. and Barroso, C. G. (2003). Study of polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A*, 1012(1), 31-38.
- Bouaoudia-Madi, N., Boulekbache-Makhlouf, L., Madani, K., Silva, A. M. S., Dairi, S., Oukhmanou-Bensidhoum, S. and Cardoso, S. M. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *myrtus communis* l. pericarp. *Antioxidants*, 8(7), 205.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie-Food Science and Technology*, 28, 25–30.

Bravo, L., Abia, R. and Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481–1487.

British Standard, BS 4267: Part 10, (1991), 8 pp.

Brune, M., Rossander, L. and Hallberg, L. (1989). Iron absorption and phenolic compound: Importance of different phenolic structures. *European Journal of Clinical Nutrition*, 43(8), 547-557.

Buszewski, B. and Szultka, M. (2012). Past, present, and future of solid phase extraction: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42, 198–213.

Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pit falls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193.

Can, E. (1999). Synthesis and Polymerization of Plant Oil Monoglyceride Maleates. Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Caner, M. (2014). ICP-MS ile Demir Analizlerindeki Girişim Etkilerinin Gıda, Cam ve Su Örneklerinde İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, İstanbul.

- Cao, G., Alessio, H. M. and Cutler, R. G., (1993). Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 14(3), 303–311.
- Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P. and Hernandez-Mendez, J. (2005). Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1089(1-2), 1-17.
- Cavuldak, Ö. A., Vural, N., ve Anlı, R. E. (2016). Ultrasound assisted extraction of plant-derived phenolic compounds. *GIDA-Journal of Food*, 41(1), 53-60.
- Ceriello, A. (2000). Oxidative stress and glycemicroregulation. *Metabolism*, 49(2), 27–29.
- Chambe, P. C. (1997). Lippincotts Mustrated Reviews. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul.
- Chan, T. V.C.T. and Reader, H. C. (2000). Understanding micro wave heating cavities, 9-35.
- Chandrasekaran K., Mehrabian Z., Spinnewyn B., Chinopoulos, C., Drieu K. and Fiskum G. (2003). Neuroprotective effects of bilobalide, a component of Ginkgobiloba extract (EGb 761) in global brain is chemia and in excitotoxicity-induced neuron aldeath. *Pharmacopsychiatry*, 36(1),89–94.
- Chemat, F., Tomao, V. and Viot, M. (2008). Ultrasound assisted extraction in food analyses. In: *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 85-99.

Chiu, C. M. and Muddiman, D. C. (2008). What is Mass Spectrometry?, American Society for Mass Spectrometry, <http://www.asms.org/whatisms>.

Chowdhury, P. and Viraraghavan, T. (2009). Sonochemical degradation of chlorinated organic compounds, phenolic compounds and organic dyes-a review. *Science of The Total Environment*, 407(8), 2474-2492.

Christie, W.W. (1990). *Gas Chromatography and Lipids*. The Oil Press: Glasgow, Scotland.

Cook, N.C. and Saman, S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J.P., Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E. and Hano, C. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 176–185.

Cordell, G. A., Lemos, T. L. G., Monte, F. J. Q., and Mattos, M. C. (2007). Vegetables as chemical reagents. *Journal of Natural Products*, 70(3), 478–492.

Coşkun, T. (2005). Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 48, 69-84.

Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones (eds), *Biochemistry*

and Molecular Biology of Plant. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD., 1250–1318.

Çelebi, Ş. ve Karaca, H. (2006). Yumurthanın besin değeri, kolesterol içeriği ve yumurtayı n-3 yağ asitleri bakımından zenginleştirmeye yönelik çalışmalar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 37(2), 257-265.

Çelik, E. E., Gökmen, V. and Fogliano, V. (2013). Soluble antioxidant compounds regenerate the antioxidants bound to insoluble parts of foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 10329–10334.

Davies, K. J. A. (1990). Protein oxidation and proteolytic degradation: general aspects and relationship to cataract formation. Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine, 503–511.

Davis, P. H. (ed.). (1965). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1, Edinburgh University Press, Edinburgh.

Davis, P. H. (ed.). (1967). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 2", Edinburgh University Press, Edinburgh.

Davis, P. H. (ed.). (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3, Edinburgh University Press, Edinburgh.

Davis, P. H. (ed.). (1975). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 5, Edinburgh University Press, Edinburgh.

Deveci, T. (2012). Gaziantep’te Atık Sulardan Etkilenen Toprak ve Bitkilerde Eser Element (Cu, Co, Mn ve Zn) ve Fe Konsantrasyonlarının ICP-MS ile Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Kilis.

Dewick, P. M. (2002). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2nd edn., JohnWiley and Sons, West Sussex, England.

Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (2006). Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(7), 2441-2469.

Disilvestro, R. A., (2001). Flavanoids as Antioxidants. In: Wildman (ed), R.E.C. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Pres, Boca Raton, FL, 127-142.

Dohi, T., Anamura, S., Shikawa, M., Okamoto, H. and Tsujimoto, A. (1991). Inhibition of lipoxygenase by phenolic compounds. Japanese Journal of Pharmacology, 55, 547–50.

Dreher, D. and Junod, A. F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. European Journal of Cancer, 32(1), 30–38.

Elibol, L. (2009). Determination of Metal Contents of Honey, Grapesyrup, Vinegar and Fruit Juices Produced in Turkey by ICP-MS Method. Master Thesis Ege University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry, İzmir.

- Eker İ., Vural, M., and Aslan, S. (2015). Ankara İli'nin Damarlı bitki çeşitliliği ve korumada öncelikli taksonları. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 2(3), 57-114.
- Epstein, F. H., Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. and Witztum, J. L. (1989). Beyond Cholesterol. *New England Journal of Medicine*, 320(14), 915-924.
- Enrique Cadenas M. D. and Lester, P. (2002). Oxidative Stress and Disease. *Handbook of Antioxidants*. 2nd Edn., Marcel Dekker, New York, Basel, USA, 5-8.
- Ersen, A., Özkan, G. ve Biçer, A., (2001). Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile gül ve nane bitkilerindeki esansiyel yağların eldesi. XV. Ulusal Kimya Kongresi, İstanbul, 4-7 Eylül.
- Ertuğrul Karaçalı, Ö. (2006). Streptozotocin ile Diabet Oluşturulmuş Sıçanlarda *Trigonellafoneumgraecum*L. Ekstraktının Böbrek Üzerindeki Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- Esen, G. (2005). *Origanum Vulgare* Subsp. *Hirtum*letsvaart'un Doğal ve Kültür Formlarından Elde Edilen Uçucu Yağlarının Kimyasal Bileşimleri ve Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, E. and Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715.

- Faulks, R. M., Sauthon, S. (2001). Carotenoids, Metabolism and Disease. In R.E.C. Wildman (ed), Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods.CRC Press, USA.
- Fellows, P. J. (2009). Food Processing Technology Principles and Practice (3rdEdition). Woodhead Publishing, Cambridge, 207-208.
- Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. V., Weiss, J. (2011). Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing, Springer, New York.
- Fiorito, S., Epifano, F., Palmisano, R., Genovese, S. and Taddeo, V. A. (2017). A re-investigation of the phytochemical composition of the edible herb *Amaranthus retroflexus* L. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 143, 183–187.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y. and Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitisvinifera*) seeds. Journal of Agriculturaland Food Chemistry, 57(11), 4988-4994.
- Goltz, C., Ávila, S., Barbieri, J. B., Igarashi-Mafra, L. and Mafra, M. R. (2018). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Macela (*Achyrolcine satureioides*) extracts. Industrial Crops and Products, 115, 227-234.
- Gong, L., Jin, C., Wu, X., & Zhang, Y. (2013). Relationship between total antioxidant capacities of cereals measured before and after in vitro digestion. International journal of food sciences and nutrition, 64(7), 850-856.

- González-Centeno, M. R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C. and Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from grape pomace (*Vitisvinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506-514.
- Gökmen, V., Serpen, A. and Fogliano, V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the “QUENCHER” approach. *Trends in Food Science & Technology*, 20(6-7), 278–288.
- Gözükara, E. M. (1989). *Biyokimya*. Baskı Ofset Repromet Ltd. Şti., Ankara.
- Grice, H. C. (1988). Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, 26(8), 717-723.
- Grob, B. (2015). Ionization Efficiency of LC-(ESI)MS/MS & LC-MS/MS Determination of Beta-Oxidation Acyl-CoA Intermediates in Cultured Fibroblasts Master thesis, University of Amsterdam.
- Guyton, K. Z. and Kensler, T. W. (1993). Oxidativemechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, 49(3), 523–544.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinellaanisum* L.) seed extracts, *Food Chemistry*, 83, 371–382.
- Gündüz T. (2001). *İnstrümental analiz*, Gazi Büro Kitapevi, Ankara.

- Güneş, F. ve Özhatay, N. (2011). An ethnobotanical study from Kars (eastern) Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 4(1), 30-41.
- Gürçan, Ü. (2001). Yağ Rafinasyonunda Oluşan Trans Yağ Asitlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Güven, K. (1999). Biyokimyasal ve moleküler toksikoloji. Dicle Üniversitesi Basım Evi, Diyarbakır.
- Güzelsoy, N. A. (2013). ICP-MS ile Bazı Gıda Takviyelerinde Element Analizleri ve Analitik Problemler. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Bursa.
- Ha, Y., Tsay, O. G. and Churchill, D. G. (2011). A tutorial and mini-review of the ICP-MS technique for determinations of transition metal ion and main group element concentration in the neuro degenerative and brain sciences. *Monatshefte Für Chemie – Chemical Monthly*, 142(4), 385–398.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet (British edition)*, 344(8924), 721-724.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews*, 55(1), 44-49.
- Halliwell, B. and Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*, 281(1-2), 9-19.

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. (2nd ed.), Clarendon Press, 543. Oxford.
- Hara, A. and Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90(1), 420-426.
- Heim, K. E., Tagliaferro, R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Henrion, M., Servaes, M., Thielecke, F. and Fogliano, V. (2018). Application of the QUENCHER methodology to the food industry. *Food Chemistry*, 240, 951–958.
- Herrera, M. C. and De Castro, M. L. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 1-7.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Kromhout, D., Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342, 1007-1011.
- Hoffman E. and Stroobant V., (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 15.
- Hu, J. P., Calomme, M., Lasure, A., De Bruyne, T., Peters, L., Vlietinck, A. and Van den Berghe, D. A. (1995). Structure–activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biological Trace Element Research*, 47, 327–31.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.

Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., and Wang, J. (2009). Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food chemistry*, 114(3), 1147-1154.

Huang, X., Kong, L., Li, X., Chen, X., Guo, M. and Zou, H. (2004). Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography B*, 812(1-2), 71–84.

Hudson, B., J., “Food Antioxidants”, Elsevier Applied Science, USA. (1990)

Husain, S. R., Cillard, J. and Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical-scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26, 2489–91.

ISO 659-1988 (E), (1988). International Organization for Standardization.

İnanç, A. L ve Yüksel, D. (2018). İhlamur bitkisinin (*Tiliacordata*) katı-sıvı ekstraksiyonunda toplam fenolik madde kinetiğinin matematiksel modellenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 22 (1), 12-20.

İzol, E. (2016). Bazı *Allium* (Yabani Sarımsak) Türlerinin Aflatoksin, Ağır Metal ve Sekonder Metabolit İçeriklerinin ICP-MS ve LC-MS/MS İle Belirlenmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. and Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of American Chemical Society*, 116(11), 4846–4851.

- Ju, Z. Y. and Howard, L. R. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (18), 5207–5213.
- Kadioğlu, I., Başaran, B. and Kaya Y. (2015). *Amaranthus retroflexus* L.: An invasive plant. *Türkiye Herboloji Dergisi*, 18(3), 74-76.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N. ve Tiftik, A. M. (1998). *Biyokimya. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayinevi Ünitesi, Konya.*
- Kameda, K. (2003). Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease Possible role for left ventricular remodelling. *European Heart Journal*, 24(24), 2180–2185.
- Kanmaz, E. Ö. (2014). Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE). *European Food Research and Technology*, 238, 85–91.
- Karabulut, H. A. ve Yandı, İ. (2006). Su ürünlerindeki omega-3 yağ asitlerinin önemi ve sağlık üzerine etkisi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23(1-3), 339-342.
- Karacabey E. and Mazza G. (2008). Optimization of solid-liquid extraction of resveratrol and other phenolics compounds from milled grapecanes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6318-6325.

- Kaufmann, B. and Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105–113.
- Kelly, G. S. (2001). Conjugated linoleic acid: a review. *Alternative Medicine Review*, 6(4), 367-382.
- Keskin, H. and Erkmen, G. (1987). *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
- Khamsah, S. M., Akowah, G., and Zhari, I. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of *Orthosiphon stamineus* benth from different geographical origin. *Journal of Sustainability Science and Management*, 1(2), 14-20.
- Kimura, Y., Okuda, H. and, Arichi, S. (1985). Effects of stilbene on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biobhim. Biohys. Acta* 834:275-278.
- Kolanowski, W. and Laufenberg, G. (2006). Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 222, 472-477.
- Koppenaar, D. W., Barinaga, C. J., Denton, M. B., Sperline, R. P., Hieftje, G. M., Schilling, G. D., Andrade, F. J. and Barnes, J. H. (2005). *MS Detectors*, American Chemical Society, USA.
- Kowalewska, Z., İzgi, B., Saraçoğlu, Ş., Güçer, Ş. (2005). Application of liquid-liquid extraction and adsorption on activated carbontothe determination of different forms of metals present in edible oils. *Chemia analityczna*, 50,1007-1019.

- Koyutürk, S. (2019). Vazoaktif İntestinal Polipeptid (VIP) ve Hipofiz Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptid (PACAP)'ın LC-MS/MS Yöntemi ile Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Kremmyda, L. S., Tvrzicka, E., Stankova, B. and Zak, A. (2011). Fatty Acids as Biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease- a review. Part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc, 155(3), 195-218.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food chemistry, 85(4), 633-640.
- Lang, Q. and Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herb and natural product studies—A practical review. Talanta, 53(4), 771–782.
- Lauterborn, W. and Ohl C. D. (1997). Cavitation bubble dynamics. Ultrasonics Sonochemistry, 4(2), 65-75.
- Leikert, J. F., Räthel, T. R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A. M. and Dirsch, V. M. (2002). Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. Circulation, 106(13), 1614-1617.
- Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F. and Alasalvar, C., (2006). Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. Food Chemistry, 99(1), 121-128.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-126.
- Lu, Y., Zhang, J., Wang, X., Lin, Q., Liu, W., Xie, X., Wang Z. and Guan, W. (2016). Effects of UV-C irradiation on the physiological and antioxidant responses of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) during storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6), 1502-1508.
- Luque de Castro, M. D. and Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1-10.
- Luque de Castro, M. D. and Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: past and present panacea. *Journal of chromatography A*, 1217 (16), 2383-2389.
- Luque de Castro, M.D. and Priego-Capote, F., (2012). Soxhlet Extraction Versus Accelerated Solvent Extraction. Elsevier, Amsterdam, 83- 103.
- Ma, Y. Q., Chen, J. C., Liu, D. H., and Ye, X. Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 16(1), 57-62.
- Mandal, S., Yadav, S., Yadav, S. and Nema, R. K. (2009). Antioxidants: A review, *journal of chemical and pharmaceutical research*, 1(1), 102-104.

- Mantovi, P., Bonazzi, G., Maestri, E. and Marmioli, N. (2003). Accumulation of copper and zinc from liquid manure in agricultural soils and crop plants. *Plant and soil*, 250(2), 249-257.
- Marr, R. and Gamse, T. (2000). Use of supercritical fluids for different processes including new developments—A review. *Chemical Engineering and Processing*, 39(1), 19–28.
- Marston, A. and Hostettmann, K. (2009). Natural product analysis over the last decades. *Planta Medica*, 75(07), 672–682.
- McChesney, J. D., Venkataraman, S. K., Henri, J. T. (2007). Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68(14), 2015–2022.
- McMaster M.C., (2005). *LC/MS A Practical User's Guide*, John Wiley & Sons, New Jersey
- McNair, H. M. and Miller, J. M. (2009). *Basic Gas Chromatography*. Second Edition, United States of America: A John Wiley & Sons.
- Meireles, M. A. A. (2003). Supercritical extraction from solid: Process design data (2001–2003). *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4-5), 321–330.
- Melguizo-Melguizo, D., Diaz-de-Cerio, E., Quirantes-Piné, R., Švarc-Gajić, J. and Segura-Carretero, A. (2014). The potential of *artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 10, 192-200.
- Mester, Z. and Sturgeon, R. (2003). *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Elsevier, Canada, 1339.

- Middleton, E. Jr. and Chithan, K. (1993). The impact of plant flavanoids on mammalian biology: Implications for immunity, in inflammation and cancer, *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman and Hall, London.
- Milacic, R. and Kralj, B. (2003). Determination of Zn, Cu, Cd, Pb, Ni and Cr in some slovenian food stuffs. *European Food Research and Technology*, 217, 211- 214.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods in Enzymology*. Academic Press 234, 279-293.
- Möckel, H. J., Welter, G. and Melzer, H. (1987). correlation between reversed-phase retention and solute molecular-surface type and area. 1. theoretical outlines and retention of various hydrocarbon classes. *Journal of Chromatography A*, 388, 255-266.
- Muchuweti, M., Nyamukonda, L., Chagonda, L. S., Ndhlala, A. R., Mupure, C. and Benhura, M. (2006). Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe. *International journal of food science & technology*, 41, 33-38.
- Naczki, M. and Shahidi, F., (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.

- Neduzhii S. A. (1962). Investigation of emulsification brought by sonic and ultrasonic oscillations. *Soviet Physics-Acoustics*, 7, 221-235.
- Ness, A. R. and Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of epidemiology*, 26(1), 1-13.
- Oliveira, E. de. (2003). Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2), 174–182.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315.
- Özkan, Y. ve Koca, S. S. (2006). Hiperlipidemi tedavisinde omega-3 yağ asitinin (balık yağı) etkinliği, *Fırat Tıp Dergisi*, 11(1), 40-44.
- Özbolat, G. ve Tuli, A. (2016). Ağır Metal Toksikitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv kaynak tarama dergisi*, 25(4), 502-521.
- Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J. P. and Mason, T. J. (2001). The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 299–301.
- Pérez-Jiménez, J. and Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5036–5040.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I. and Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant

capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274–285.

Perrin, D.D. and Dempsey, B. (1974). *Buffers for pH and Metal Ion Control*, John Wiley, Chapman and Hall, London, 161-162.

Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J. and Núñez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85(2), 267–273.

Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11.

Pokorný, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (2001). Introduction, In: *Antioxidants in Food, Practical Applications*, (Eds), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2.

Prior, R. L. and Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods 1. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1173–1181.

Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.

Ramanathan, L. and Das, N. P. (1993). Effect of natural copper chelating components on the pro-oxidant activity of ascorbic acid in steam-cooked ground fish. *International Journal of Food Science & Technology*, 28, 279–88.

- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., and Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189–207.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Reische, D. W., Lillard, D. A. and Eitenmiller, R. R. (2002). Oxidation. *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marcel Dekker Inc., New York, 335-542.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956.
- Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N. and Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
- Rostagno, M. A., Palma, M. and Barroso, C. G. (2003). Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119–128.

- Saldamlı İ., Kayahan, M. (2005). Gıda Kimyası. Lipidler, 3.Bölüm, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, sayfa 133–221, ISBN: 975–941–190–8.
- Sanchez, M. C., Larrauri, J. A., Saura, C. F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Sandra, P. (2004). *Advanced Separation Science*. Ghent University, Belgium.
- Senesi, G. S., Baldassarre, G., Senesi, N. and Radina, B. (1999). Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere*, 39, 343–37.
- Serpen, A. and Gökmen, V. (2009). Evaluation of the Maillard reaction in potato crisps by acrylamide, antioxidant capacity and color. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6), 589–595.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V. and Gökmen, V. (2007). A New Procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7676-7681.
- Serpen, A., Gökmen, V., Pellegrini, N., and Fogliano, V. (2008a). Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 816–820.
- Serpen, A., Gökmen, V., Karagöz, A. and Köksel, H. (2008b). Phytochemical Quantification and Total Antioxidant Capacities of Emmer (*Triticum dicoccon*Schrank) and Einkorn (*Triticum monococcum*L.) Wheat Landraces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7285–7292.
- Serpen, A., Gökmen, V. and Fogliano, V. (2012a). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats, *Meat Science*, 90(1), 60-65.

- Serpen, A., Gökmen, V. and Fogliano, V. (2012b). Solvent effects on total antioxidant capacity of foods measured by direct QUENCHER procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 52–57.
- Sevgi, E., Hançer, Ç. K., Akkaya, M. and Çakır, E. A. (2018). Local names of plants which have traditional usages in Biga and their naming approaches. *Avrasya Terim Dergisi*, 6(1), 35-47.
- Shahidi, F. (1997). *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*. The American Oil Chemists Society Press, Champaign, Illinois.
- Shi, H., Noguchi, N., and Niki, E., (2001). Intoducing Natural Antioxidants. In J.Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press,USA.
- Sies, H. (1991). Oxidativestress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3), 31–38.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*. Academic Press, 299, 152-178.
- Skoog, D. A., Holler, F. H. and Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*, Thompson Brooks, 17-21, California, USA.

- Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A. (1998). Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu, F. ve Yılmaz, H. Saunders College Publishing, USA, Bilim Yayıncılık, 231- 262, Ankara.
- Skoog, D. A., James Holler, F. and Nieman, T. A. (1999). Fundamentals of Analytical Chemistry, Seventh Edition, Kılıç, E. ve Köseoğlu, F., Saunders College Publishing, USA, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28 (1), 49-5.
- Smith, R. M. (2002). Extractions with superheated water. Journal of Chromatography A, 975(1), 31–46.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J, and Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York .
- Snyder, L. R., Kirkland, J.J. ve Dolan J. W. (2010). Introduction to Modern Liquid Chromatography, Thirth Edition, A John Wiley&Sons, Inc.,Publication, Hoboken, New Jersey.
- Sözbilir, N. and Bayşu, N. (2008). Biyokimya. Güneş Tıp Kitabevleri, İskitler/Ankara.
- Spacil, Z., Novakov, L. and Solich, P. (2008). Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. Talanta, 76(1), 189-199.

- Spigno, G., Tramelli, L. and De-Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208.
- Stevigny, C., Rolle, L., Valentini, N. and Zeppa, G. (2007). Optimization of extraction of phenolic content from hazelnut shell using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(15), 2817–2822
- Storz, G. and Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 188–194.
- Suschetet, M., Siess, M. H., Le Bon A. M. ve Canivenc Lavier M. C. (1998). INRA Edition, Polyphenols 96, Les Colloques, Paris, 166-204.
- Takahama, U. (1985). Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: mechanism of antioxidative function. *Phytochemistry*, 24(7), 1443–1446.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. and El-Elmat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- Tekeli, Y. ve Sezgin, M. (2007). *Centaurea carduiiformis* (Peygamber Çiçeği)'in antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, (E-Dergi) Fen Dergisi, 2(2), 204-209.

Temel, M. K. (2019). Sık Kullanılan Antidepresan İlaçlar için LC-MS/MS ile Eş Zamanlı Analiz Yöntemi Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Düzce.

Tepebaş, K. (2012). *Lathyrus Rotundifolius* WILD. (Hatun Parmağı) bitkisinden farklı tekniklerle elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin karşılaştırmalı tayinleri. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.

Thomas, R. (2004). Practical Guide to ICP-MS, Marcel Dekker, Inc., USA.

Toubane, A., Rezzoug, S. A., Besombes, C., and Daoud, K., (2017). Optimization of accelerated solvent extraction of *carthamus caeruleus* l. evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Industrial Crops and Products*, 97, 620–631.

Tsoupras, G. (2005). LC/MSⁿ (ion trap) & LC/MSD (quadrupole) Sistemi ve Uygulamaları Çalıştay Kitabı, SEM Laboratuvar Cihazları Paz. San. Ltd. Şti., İstanbul.

Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M. and Ursini, F. (1998). Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(7-8), 1228–1234.

Tufan, A. N. (2012). Tahıllarda Spektrofotometrik Toplam Antioksidan Kapasite Tayini ve Antioksidan Bileşenlerin Kapiler Elektroferezle Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Tufan, A. N., Çelik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K. and Apak, R. (2013). Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method. *Talanta*, 108, 136–142.
- Tunalier, Z., Öztürk, N., Koşar, M., Başer, K.H.C., Duman, H. and Kırimer, N., (2002). Bazı sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolikbilesikler yönünden incelenmesi. *Bitkisel ilaç Hammaddeleri Toplantısı*.
- Turhan, S. F. (2006). Karkas Yapısı, Kıl Morfolojik Özellikleri ve Yağ Asitleri Kompozisyonlarına Göre Et Hayvan Türlerinin Tanınması Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tutanç, L., (2009). Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi ile Eroin, Kokain ve Amfetamin Grubu Maddelerin Birlikte Analizi için Yöntem Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.
- Tüzen, M. (2002). A comparison of sample preparation procedures for the determination of heavy metals in Lichen samples by GFAAS. *Analytical Letters*, 35(10),1667–1676.
- Tüzün, C. (1992). *Biyokimya*. Palme Yayınları, Ankara.
- Tvrzicka, E., Kremmyda, L.S., Stankova, B. and Zak, A. (2011). Fatty Acids as Biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease- a review. Part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 155(2), 117-130.
- US EPA (1986). Method 8100, US Government Printing Office, Washington, DC, USA.

US EPA (1995). Method 3540, US Government Printing Office, Washington, DC, USA.

Valiente, L., Piccinna, M., Ale, E. R., Grillo, A. and Smichowski, P. (2002). Determination of Selenium in Dietary Supplements by ETAAS and HG-AAS: A Comparative Study. *Atomic Spectroscopy*, 23, 129-134.

Valkonen, M. and Kuusi, T. (1997). Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research*, 38, 823-833.

Vinatoru, M., Toma, M. and Mason, T.J. (1999). Ultrasound-assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. In *Advances in Sonochemistry*, Mason TJ (ed), JAI Press, UK, 5, 209–248.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303–313.

Vitaglione, P., Napolitano, A. and Fogliano, V. (2008). Cerealdietaryfibre: a natural functional ingredientto deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science&Technology*, 19(9), 451-463.

Vogeser, M. and Kirchhoff, F. (2011). Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 4–13.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20.

- W.H.O., (2007). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues(P:24).
- Wang, L. and Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 300-312.
- Watson, J. T., Sparkman, O. D. (2007). *Introduction of Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*. (4th Eds), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 978-0-470-51634-8, West Sussex, England.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. and Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 187(1), 33–37.
- Weidner, S., Powalka, A., Karamać, M. and Amarowicz, R. (2012). Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines-Comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3444–3457.
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J. and Whysner, J. (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 1027-38.
- Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O. and Inoue, T. (2007). Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*) fruit. *Food Chemistry*, 100(1), 171-177.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T. and Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21(1), 381-406.

Yanishlieva-Maslarova, N. V. (2001). Inhibiting oxidation. In: Antioxidants in Food, J Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), CRC Press, USA,7-20.

Yener, İ. (2017). *Euphorbia* Türlerinin Ağır Metal ve Türe Özgü Sekonder Metabolit İçeriklerinin LC-MS/MS, LC-MS-IT-TOF ve ICP-MS ile Metot Validasyonu; Antioksidan ve Antikanser Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

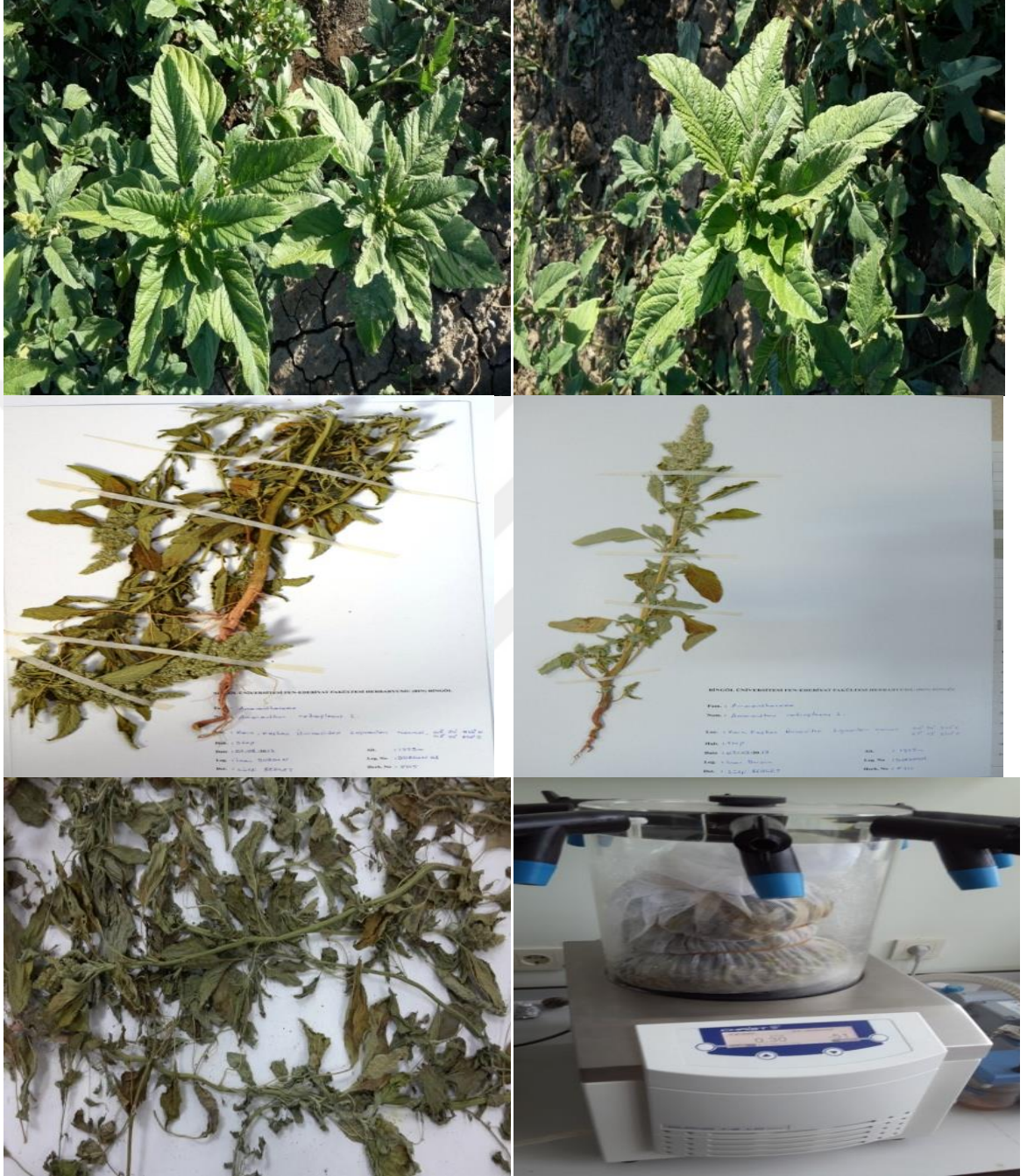
Yıldız, N. (2003). Toprak kirletici ağır metaller ve toprak bitki ilişkileri. 1. Ulusal Çevre Sempozyumu. Atatürk Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi Müdürlüğü. Erzurum.

Yılmaz M. A. (2015). Bazı Achilleatürlerinin LCMS-IT/TOF ve LC-MS/MS ile Metabolik Profillerinin Çıkarılması ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Diyarbakır Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Diyarbakır.

Young, I.S. and Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease, Journal of Clinical Pathology, 54, 176-186.

Zotou, A. (2012). An overview of recent advances in HPLC instrumentation, Central European Journal of Chemistry, 10(3), 554-569.

7. EKLER

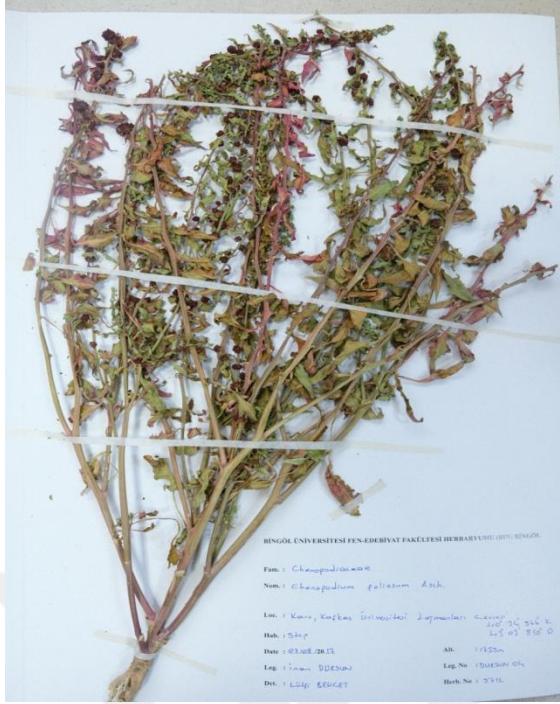


Ek Şekil 1: *Amaranthus retroflexus* L. bitkisine ait resimler.





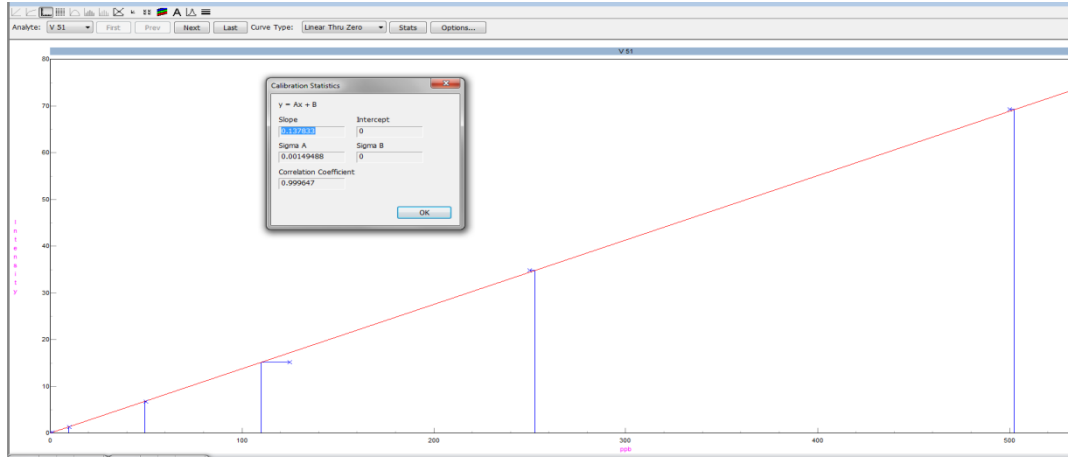
Ek Şekil 3: *Lathyrus tuberosus* L. bitkisine ait resimler



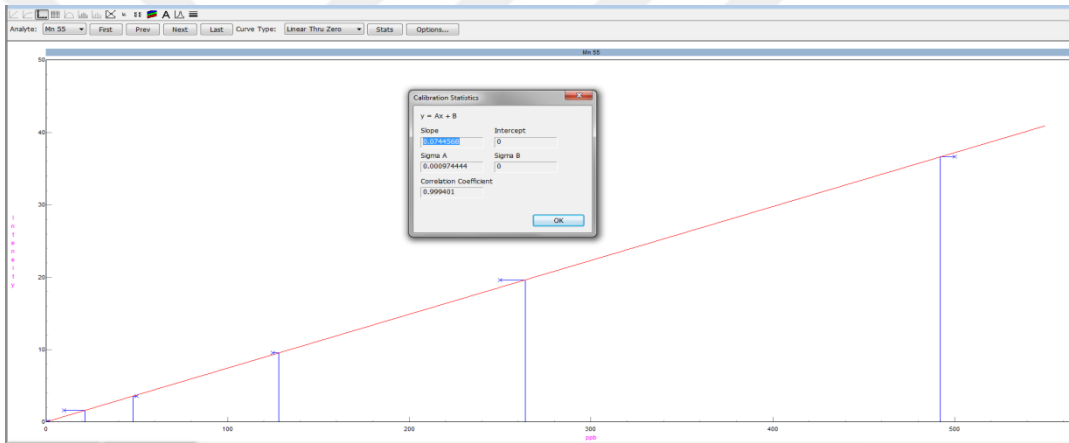
Ek Şekil 4: *Chenopodium foliosum* Aschl. bitkisine ait resimler



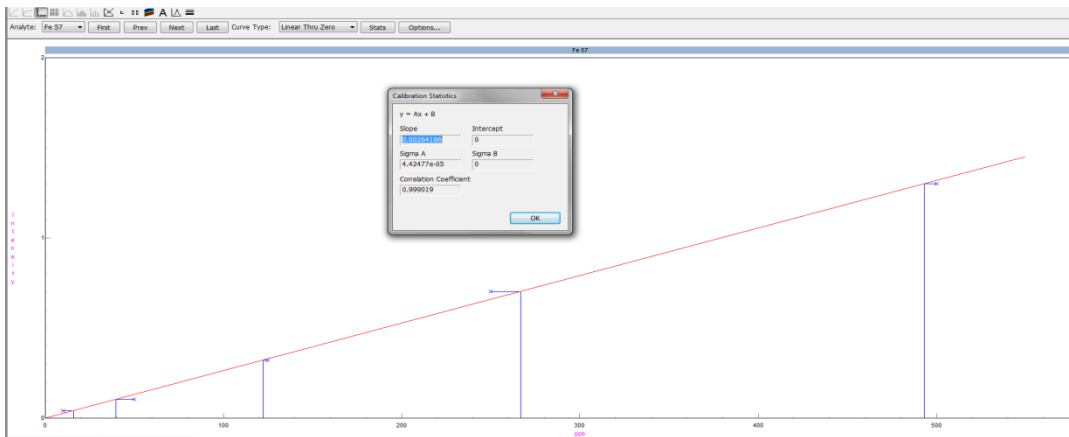
Ek Şekil 5: *Caltha polypetala* Hochst. ex Lorent bitkisine ait resimler



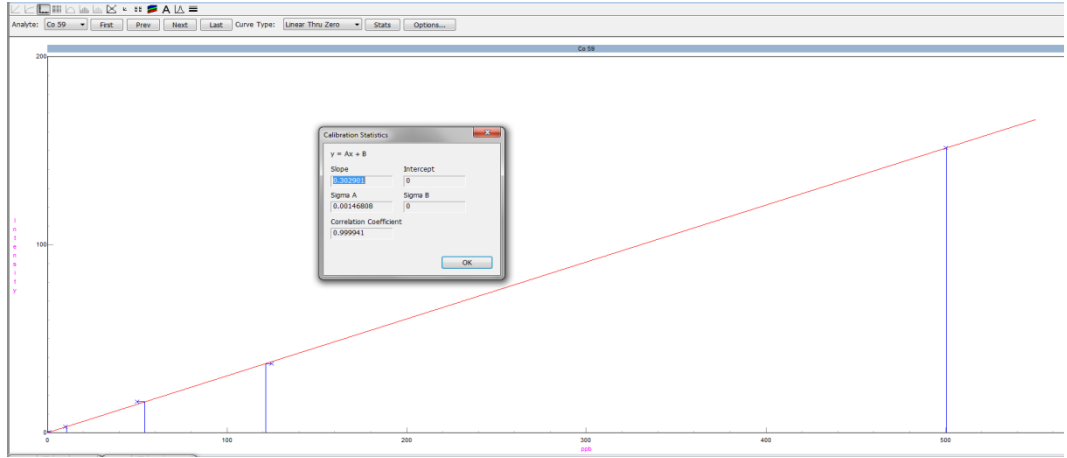
Ek Şekil 6: ICP-MS metal analizinde V'un kalibrasyon grafiği.



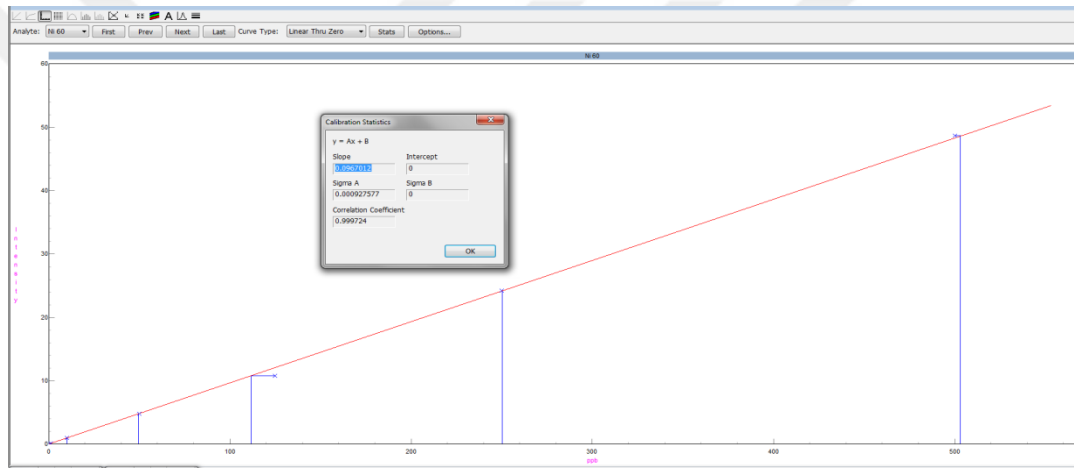
Ek Şekil 7: ICP-MS metal analizinde Mn'nin kalibrasyon grafiği.



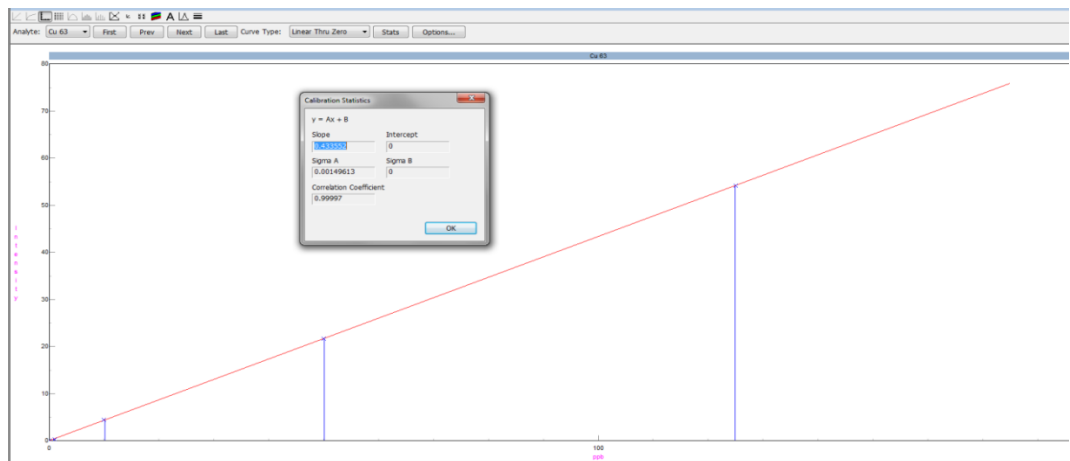
Ek Şekil 8: ICP-MS metal analizinde Fe'nin kalibrasyon grafiği.



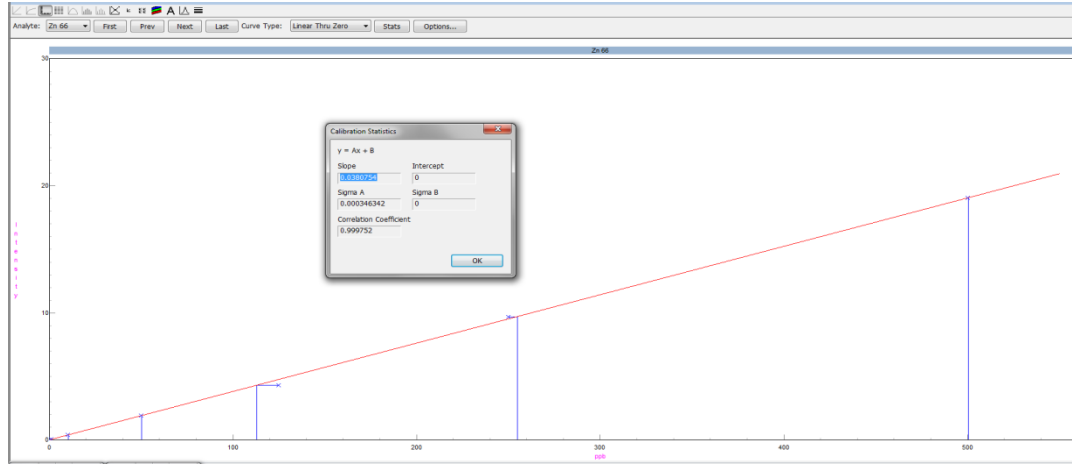
Ek Şekil 9: ICP-MS metal analizinde Co'nin kalibrasyon grafiği.



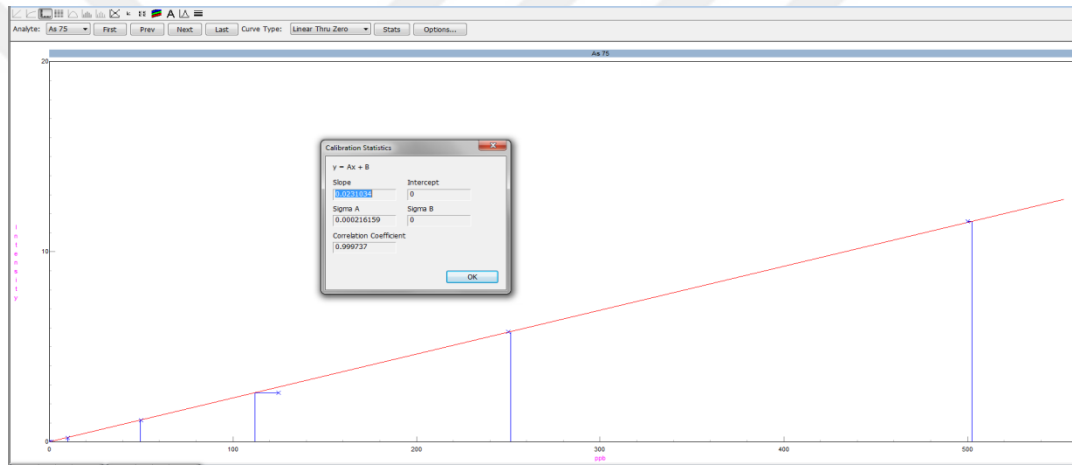
Ek Şekil 10: ICP-MS metal analizinde Ni'nin kalibrasyon grafiği.



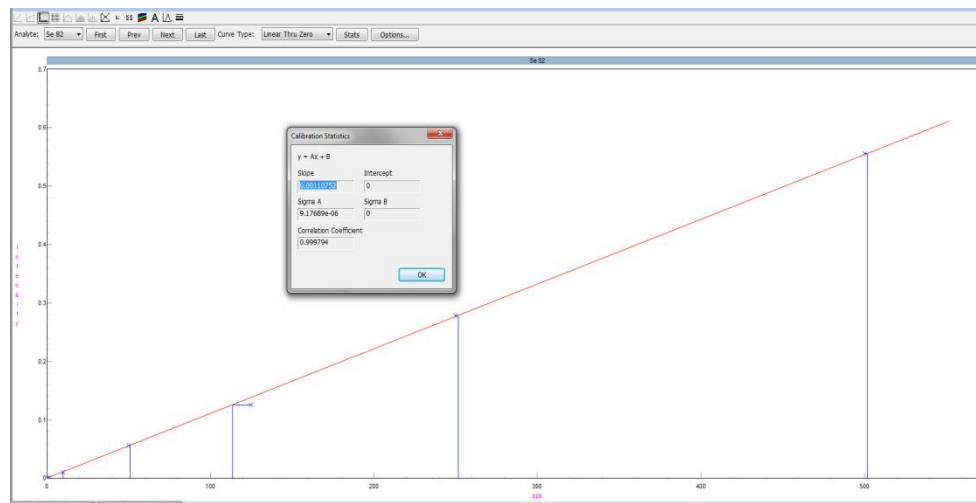
Ek Şekil 11: ICP-MS metal analizinde Cu'un kalibrasyon grafiği.



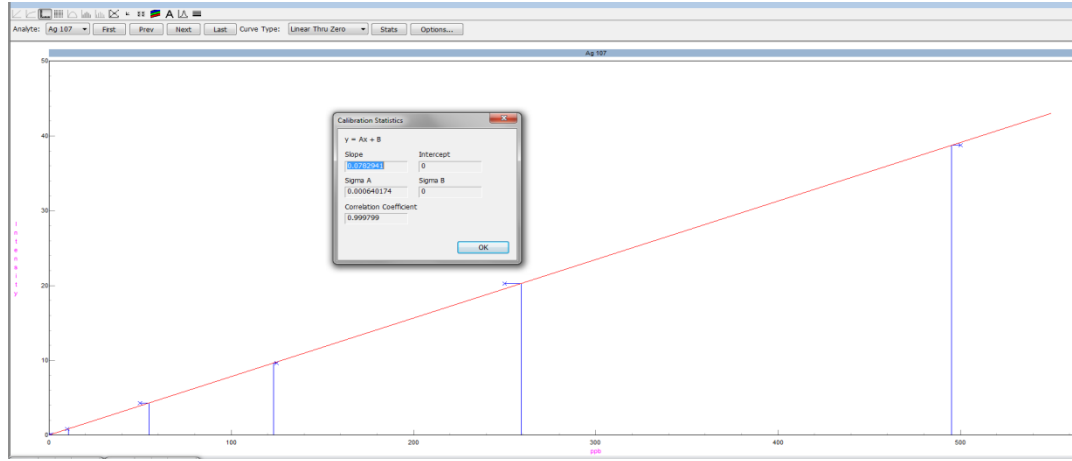
Ek Şekil 12: ICP-MS metal analizinde Zn'nin kalibrasyon grafiği.



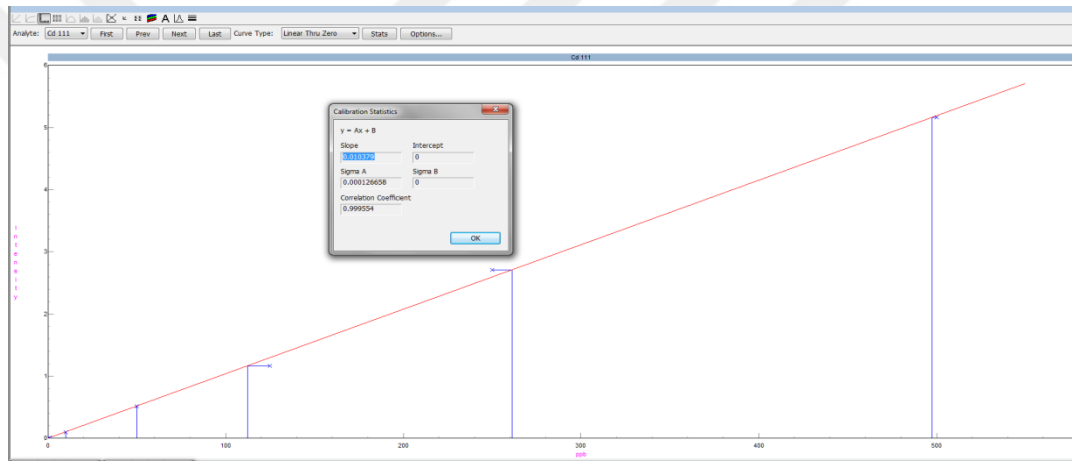
Ek Şekil 13: ICP-MS metal analizinde As'nin kalibrasyon grafiği.



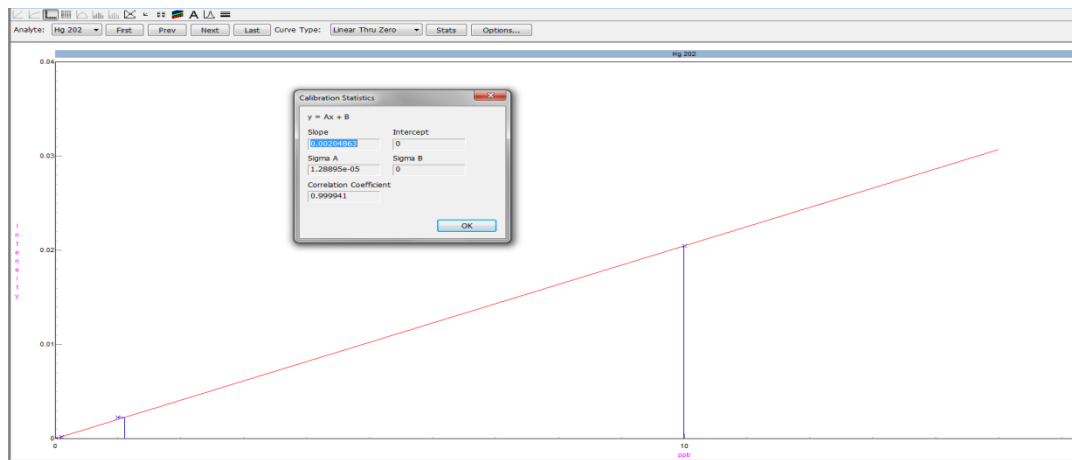
Ek Şekil 14: ICP-MS metal analizinde Se'nin kalibrasyon grafiği.



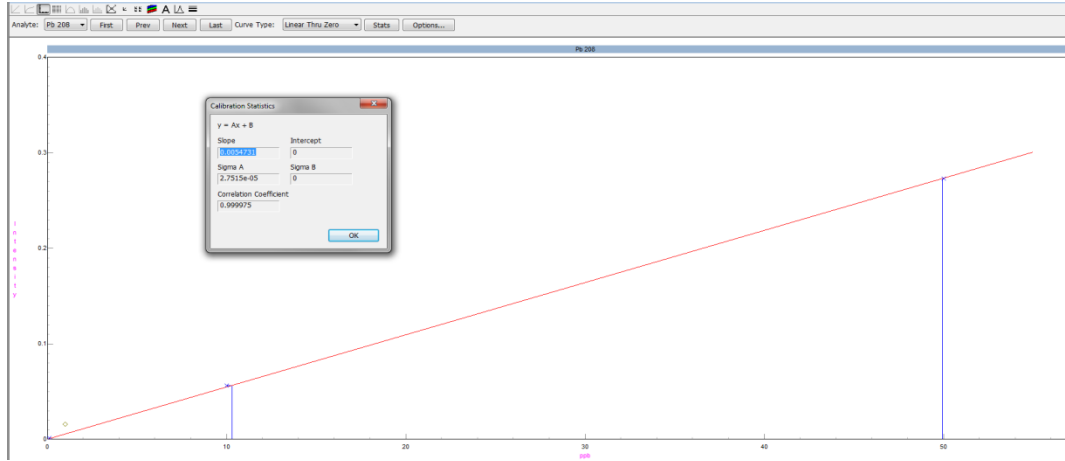
Ek Şekil 15: ICP-MS metal analizinde Ag'nin kalibrasyon grafiği.



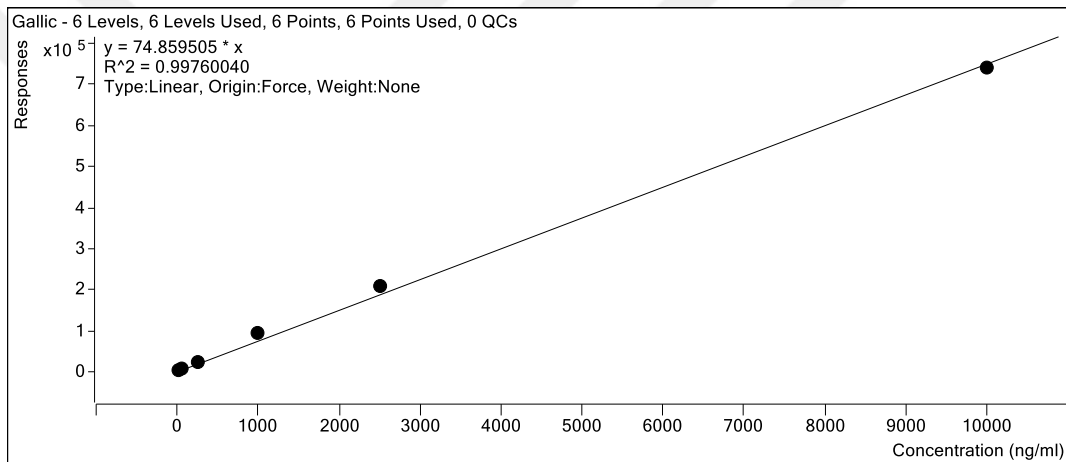
Ek Şekil 16: ICP-MS metal analizinde Cd'nin kalibrasyon grafiği.



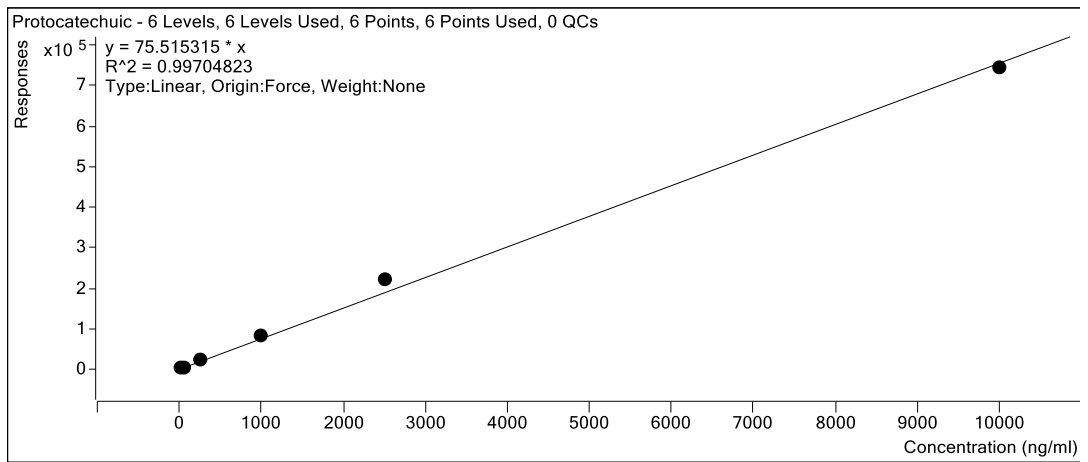
Ek Şekil 17: ICP-MS metal analizinde Hg'nin kalibrasyon grafiği.



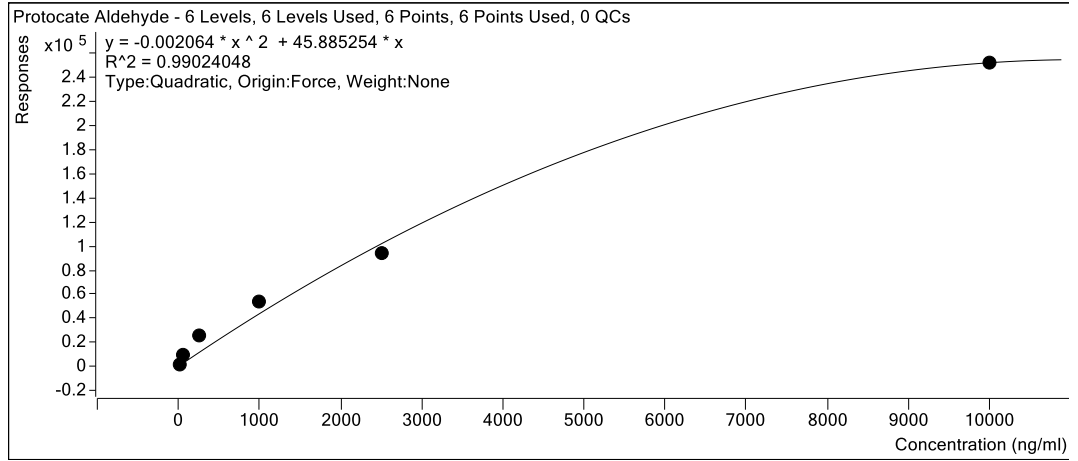
Ek Şekil 18: ICP-MS metal analizinde Pb'nin kalibrasyon grafiği.



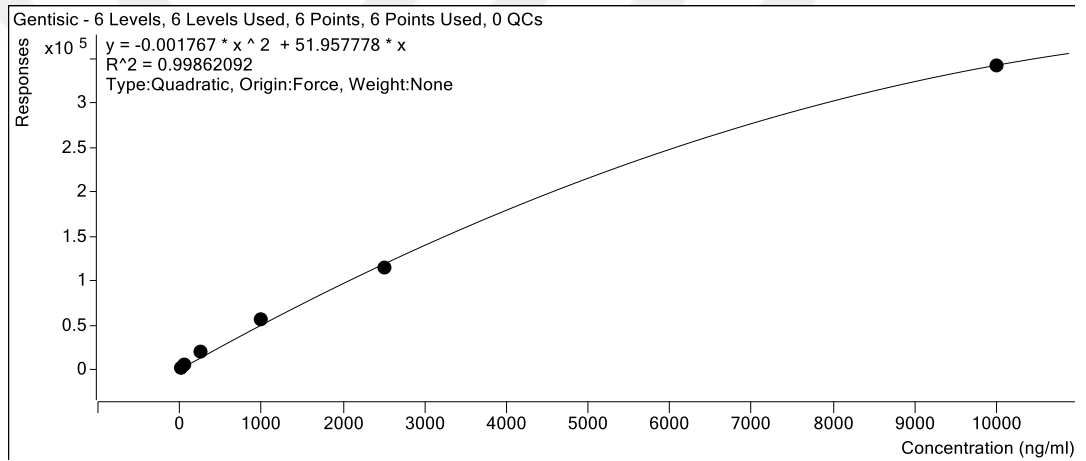
Ek Şekil 19: Gallik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



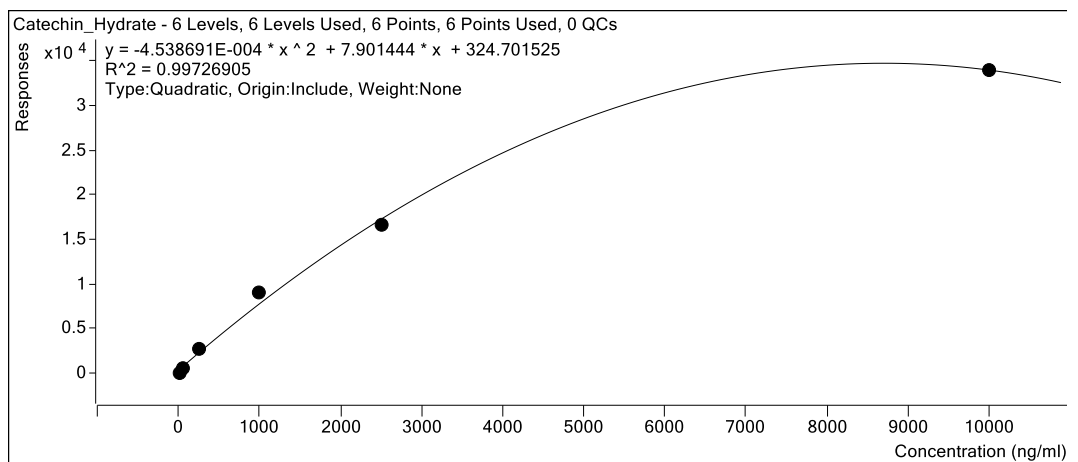
Ek Şekil 20: Protokatekuik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



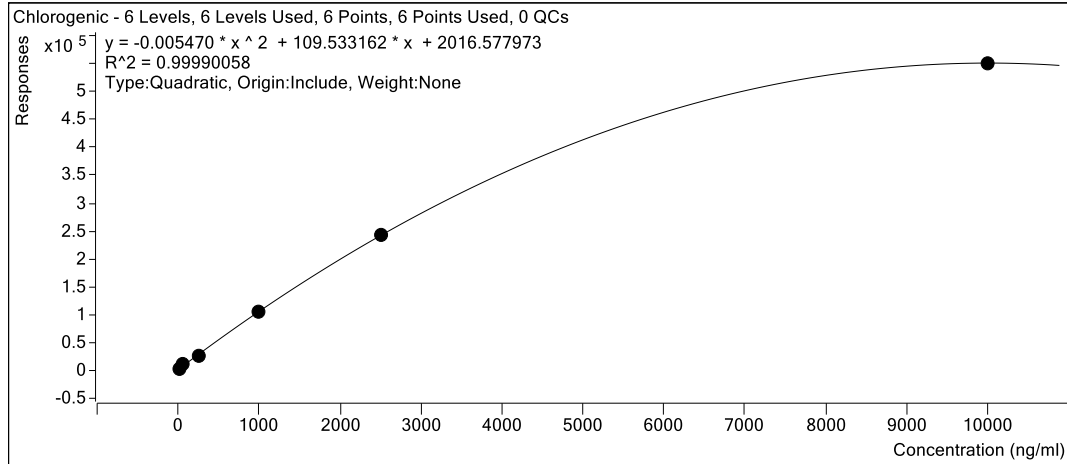
Ek Şekil 21: Protokatekaldehit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



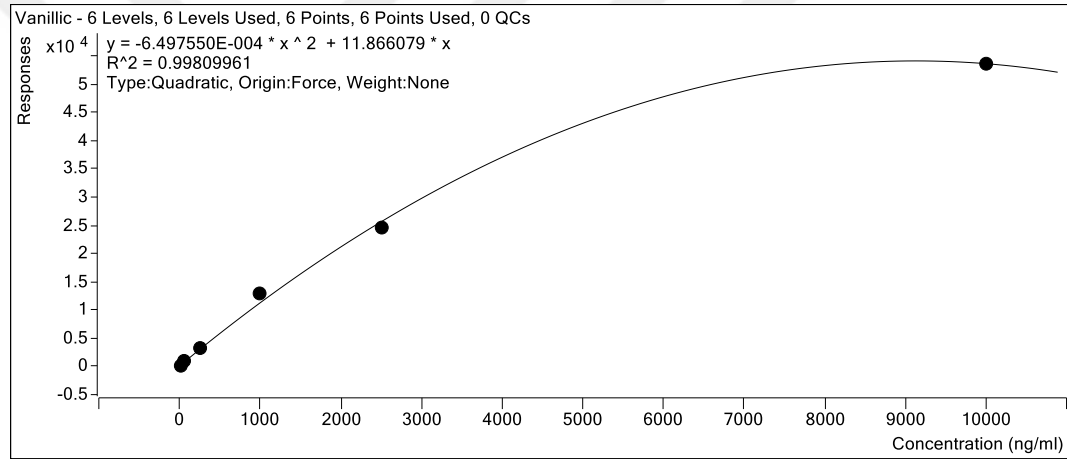
Ek Şekil 22: Gentisik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



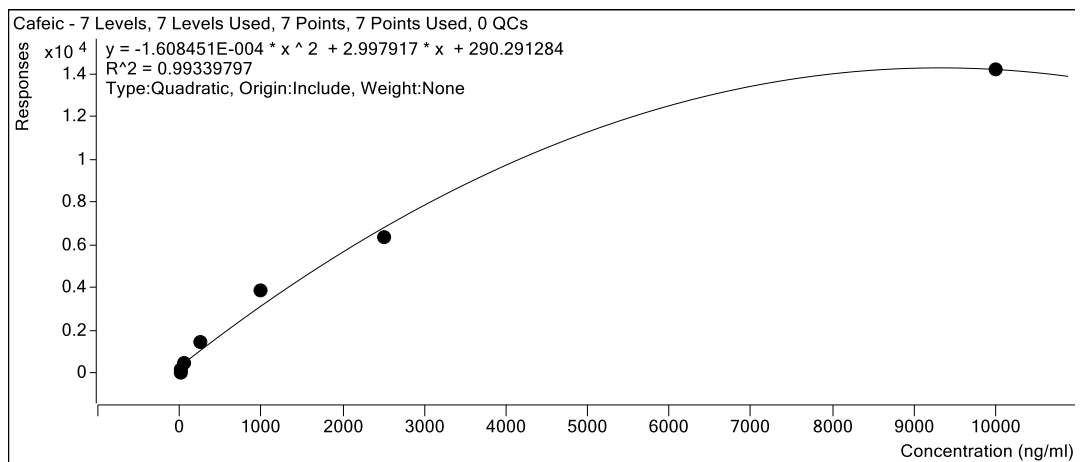
Ek Şekil 23: Katekhin hidrat'ın LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



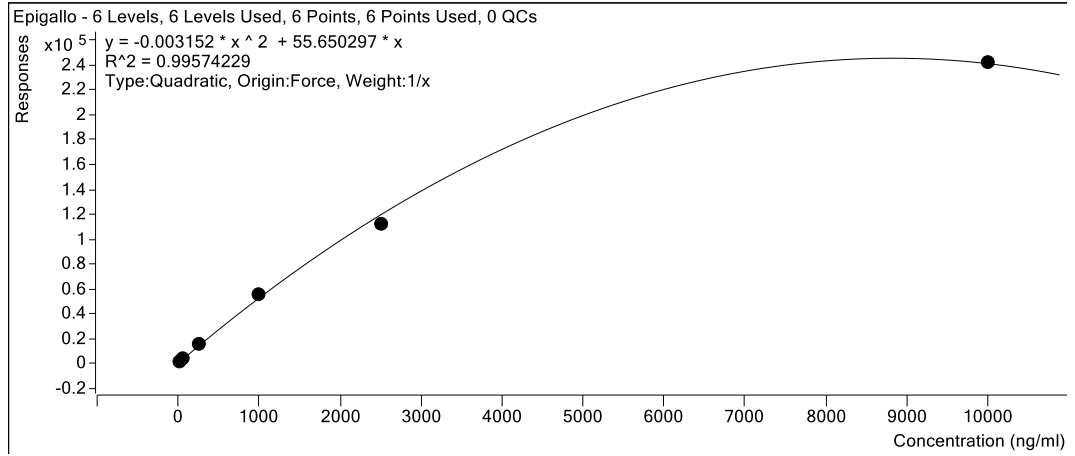
Ek Şekil 24: Klorojenik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



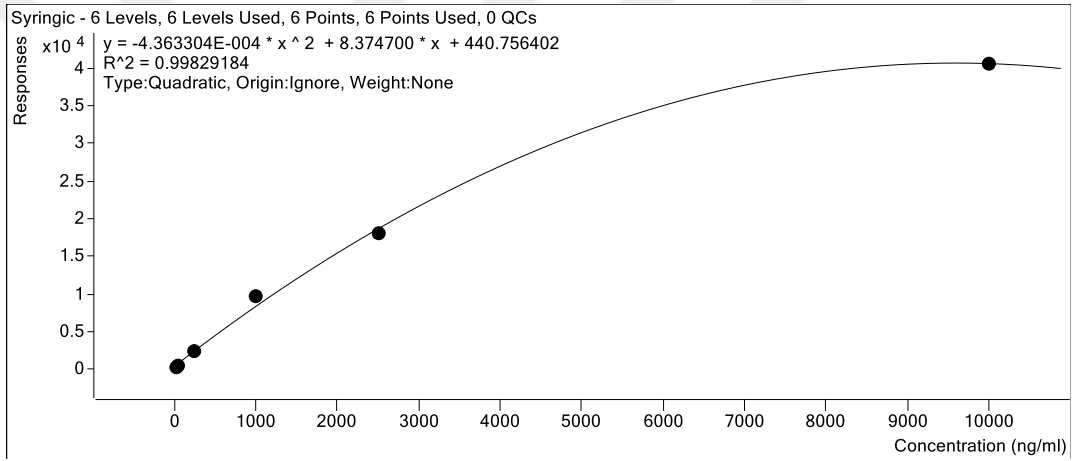
Ek Şekil 25: Vanilik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



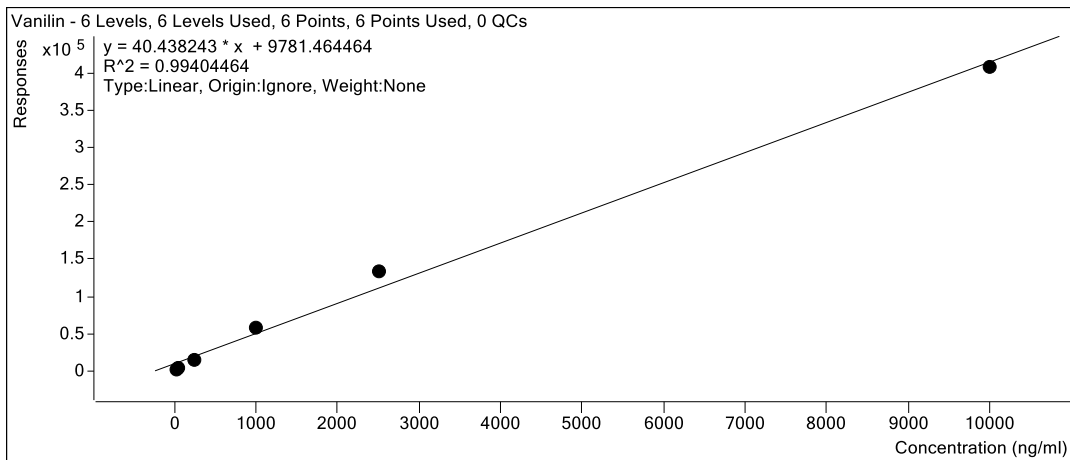
Ek Şekil 26: Kafeik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



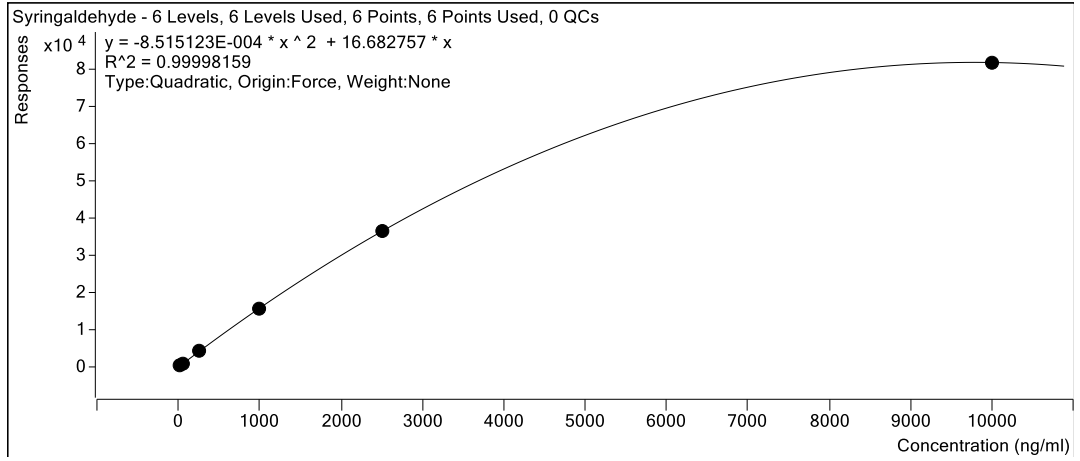
Ek Şekil 27: Epigallocatechin Gallat'ın LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



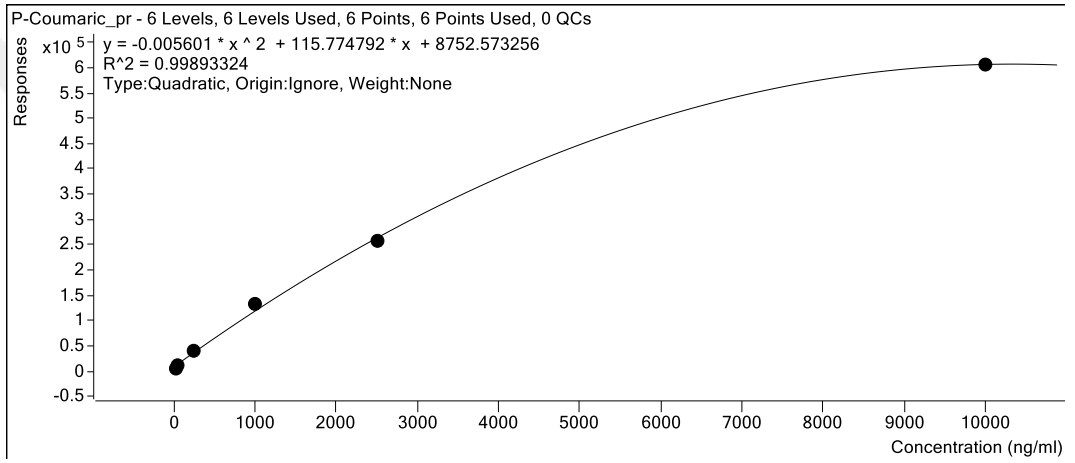
Ek Şekil 28: Siringik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



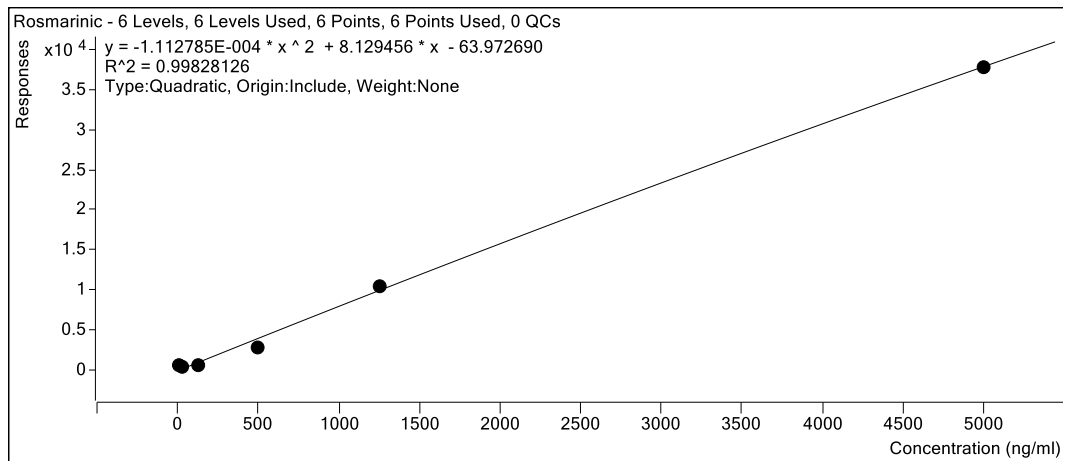
Ek Şekil 29: Vanilin'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



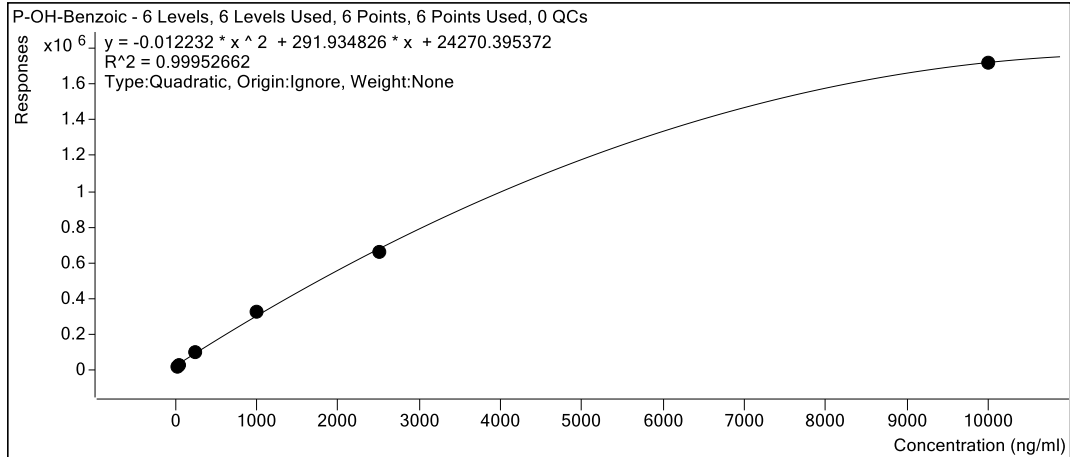
Ek Şekil 30: Syringaldehit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



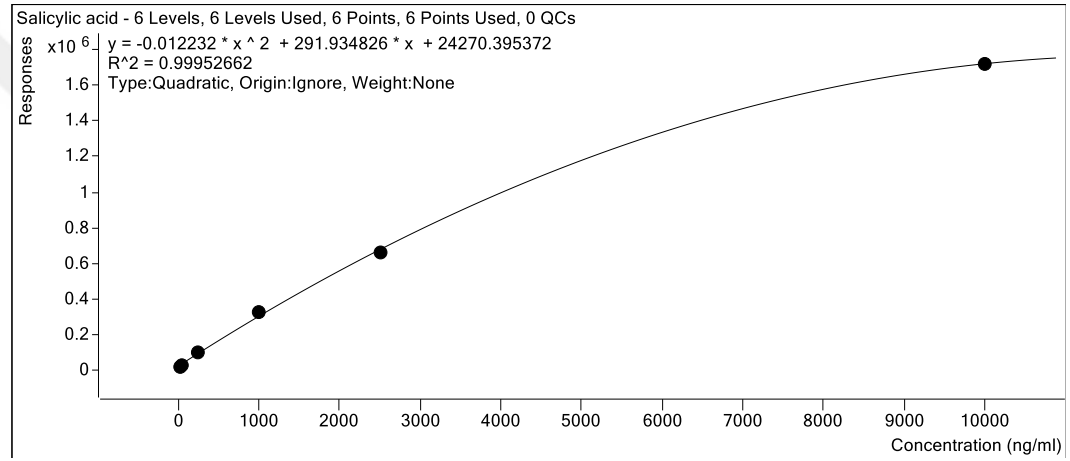
Ek Şekil 31: *p*-Kumarik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



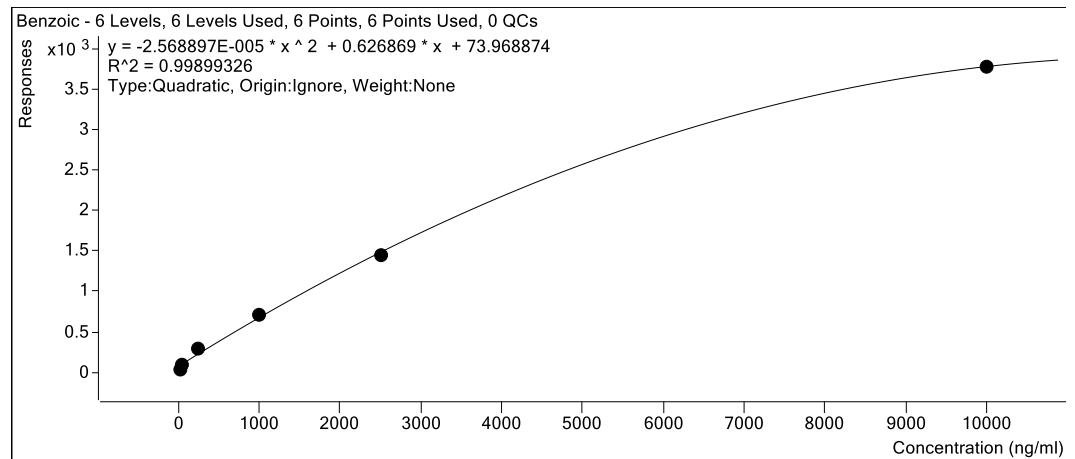
Ek Şekil 32: Rosmarinik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



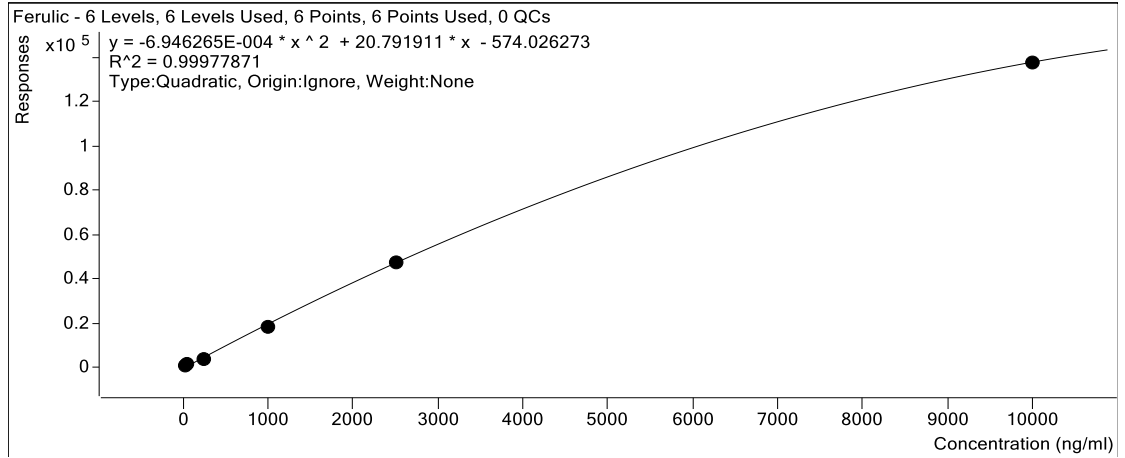
Ek Şekil 33: *p*-hidroksi benzoik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



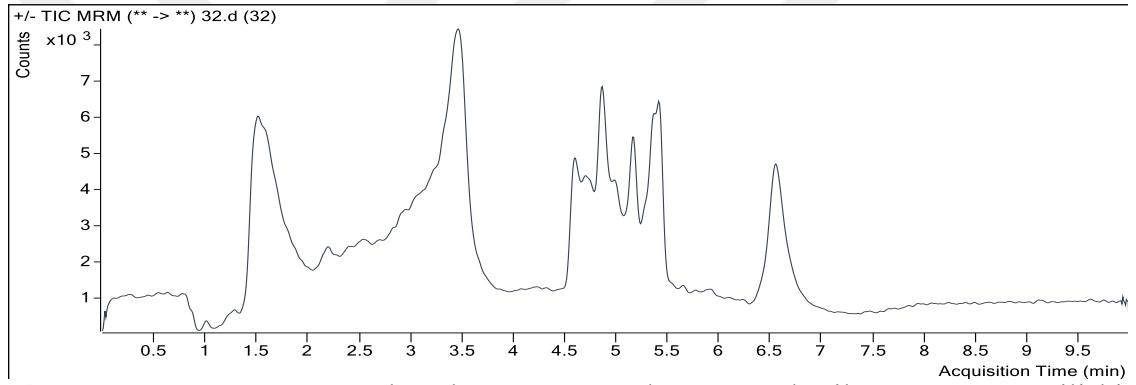
Ek Şekil 34: Salisilik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



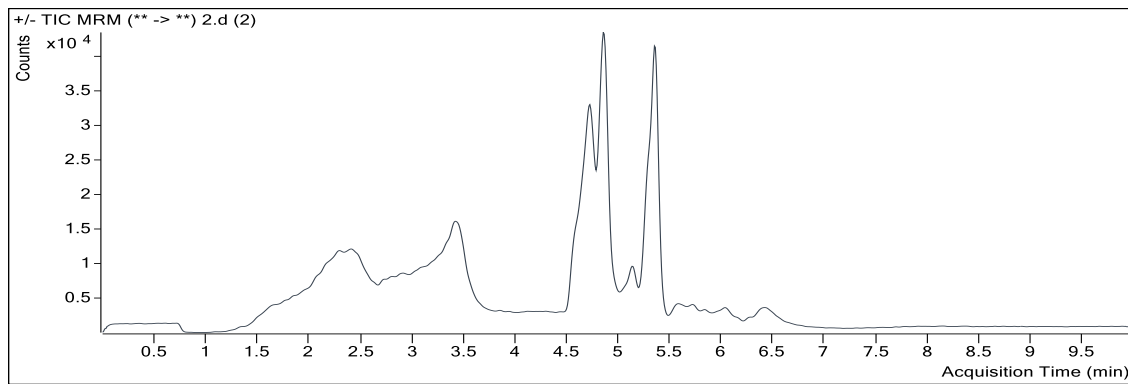
Ek Şekil 35: Benzoik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



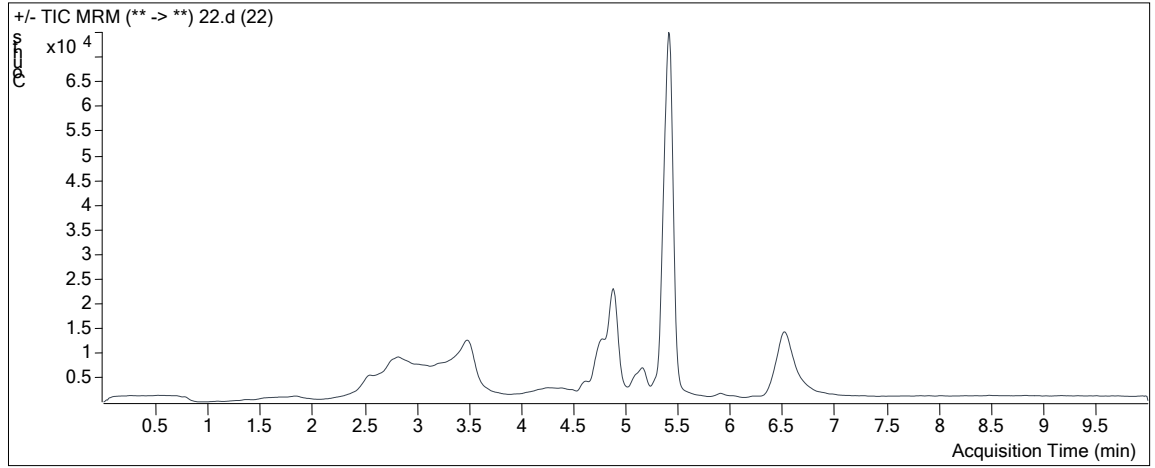
Ek Şekil 36: Ferulik asit'in LC-MS/MS metodundaki kalibrasyon grafiği



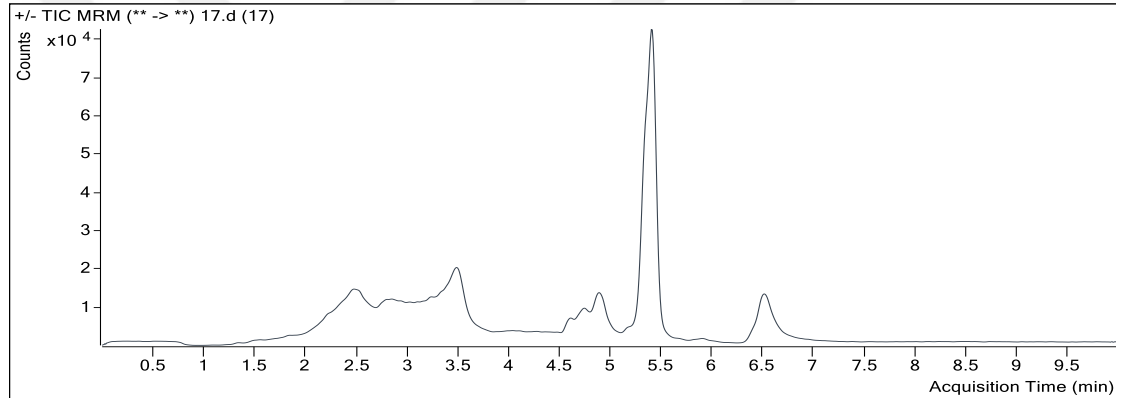
Ek Şekil 37: ARH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



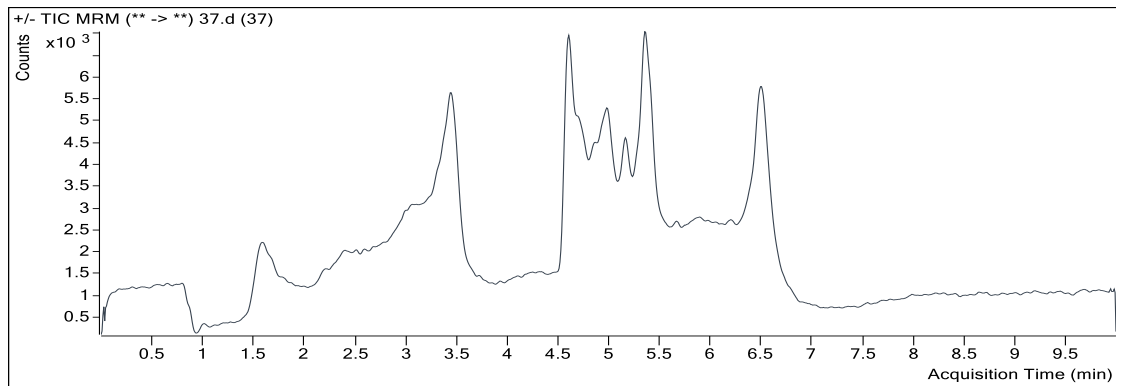
Ek Şekil 38: ARH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



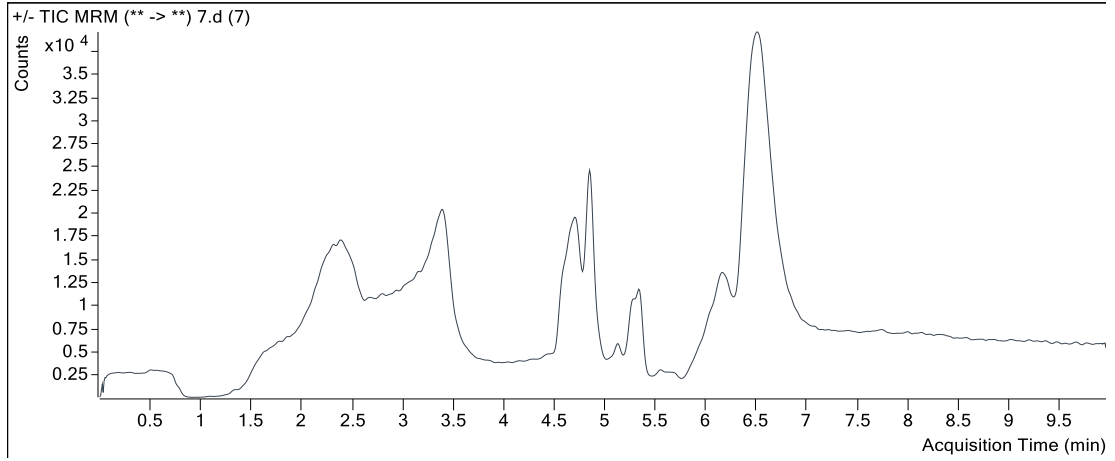
Ek Şekil 39: ARH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



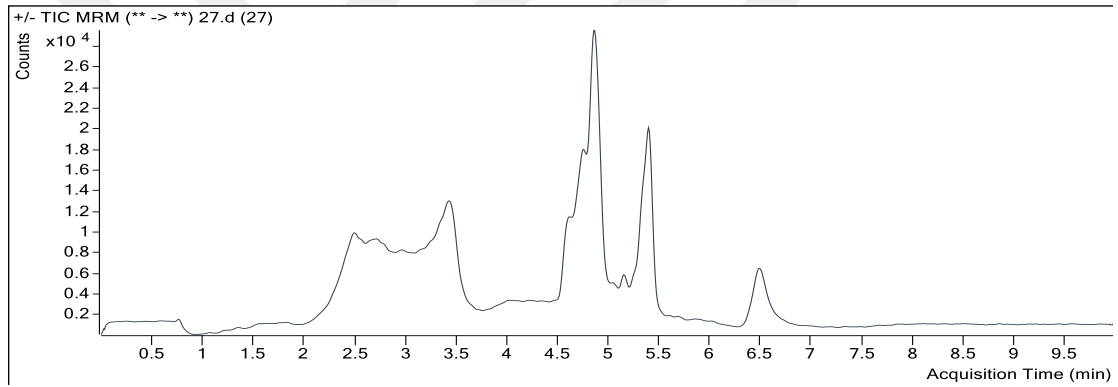
Ek Şekil 40: ARL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



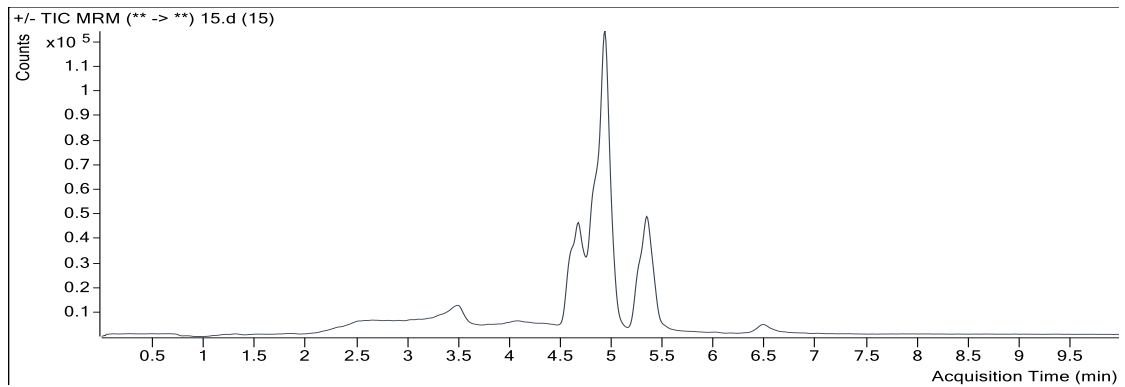
Ek Şekil 41: ARL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



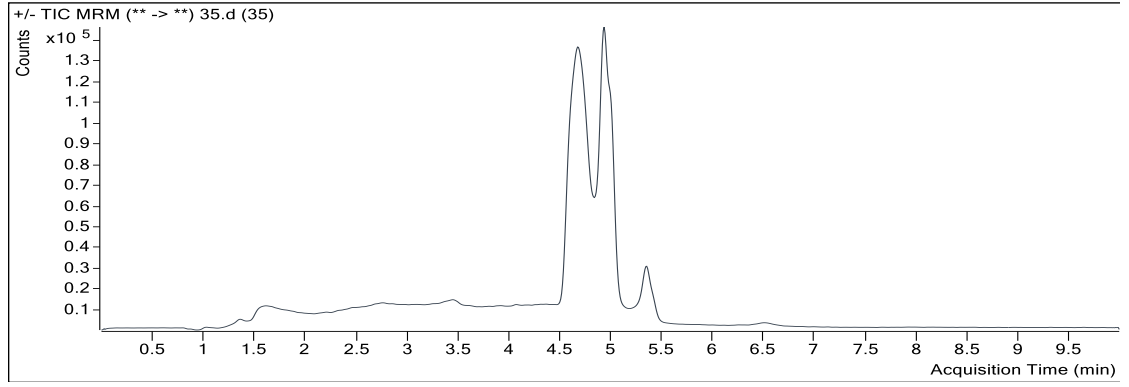
Ek Şekil 42: ARL UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



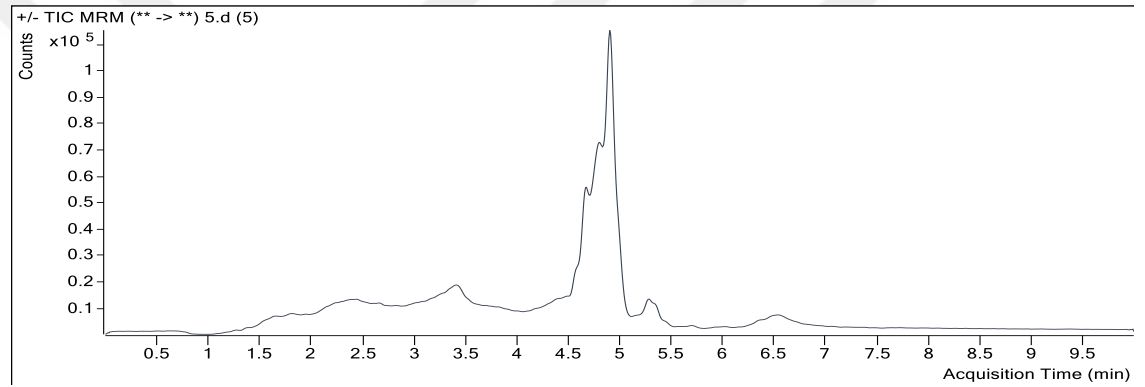
Ek Şekil 43: ARL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



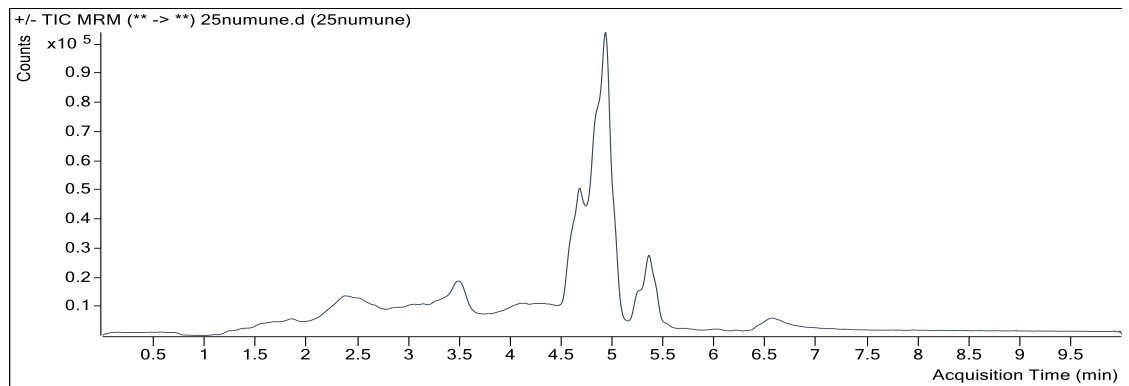
Ek Şekil 44: EVH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



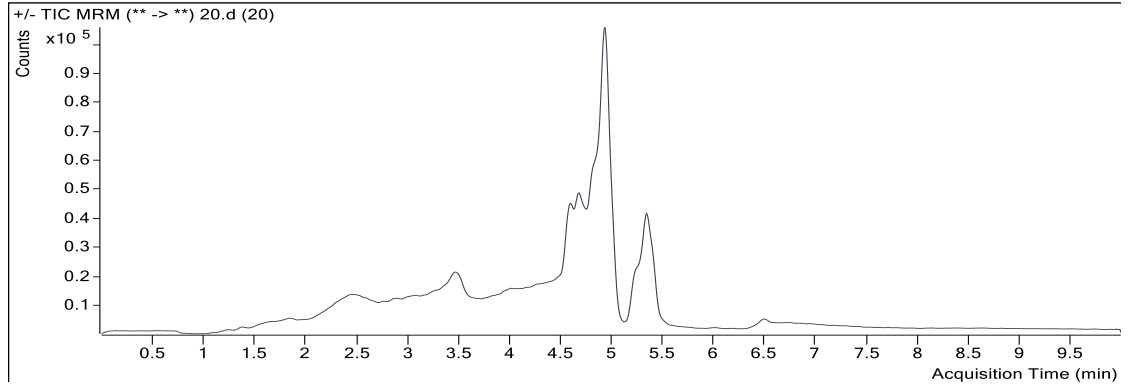
Ek Şekil 45: EVH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



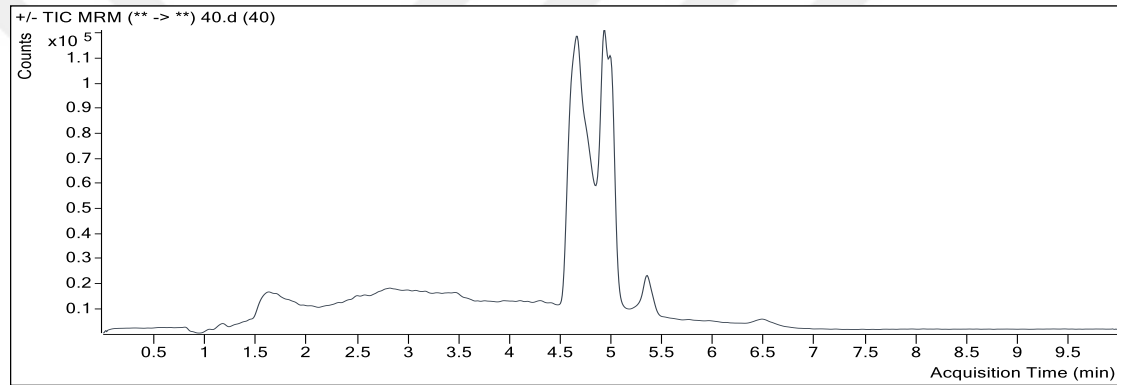
Ek Şekil 46: EVH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



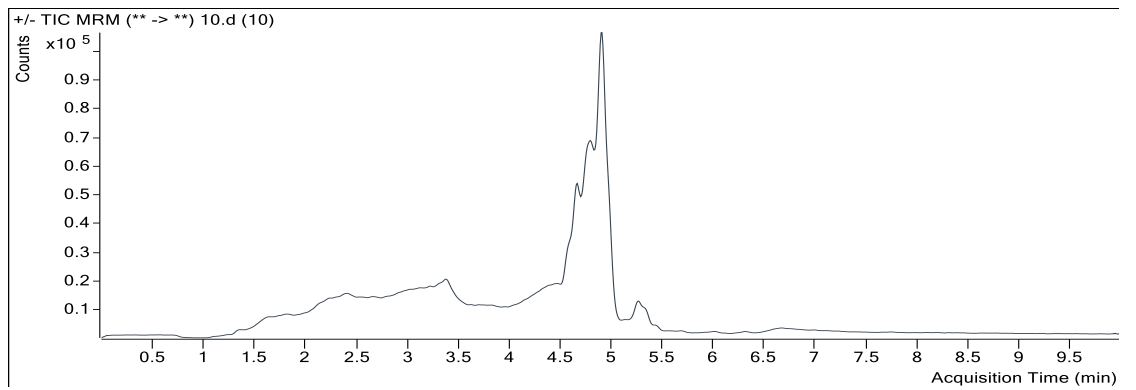
Ek Şekil 47: EVH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



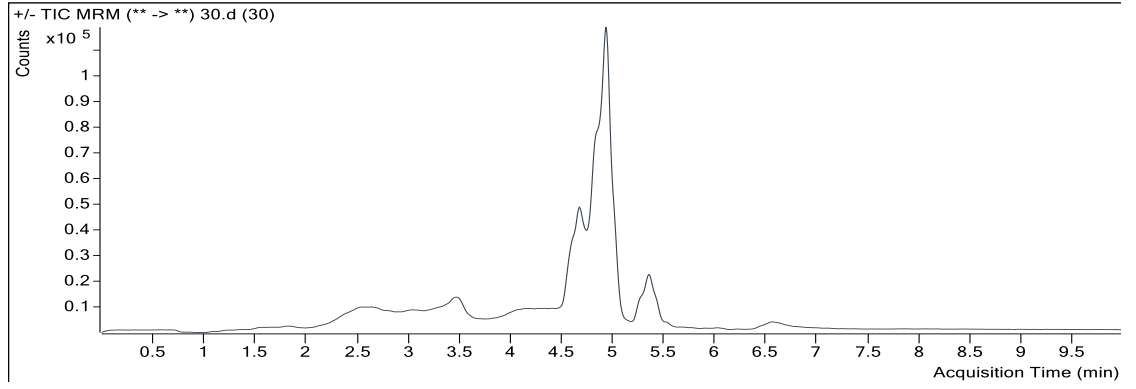
Ek Şekil 48: EVL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



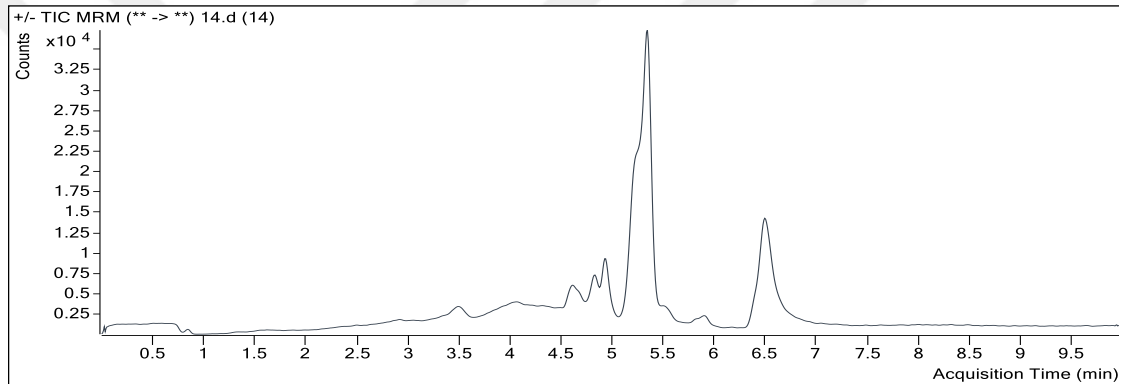
Ek Şekil 49: EVL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



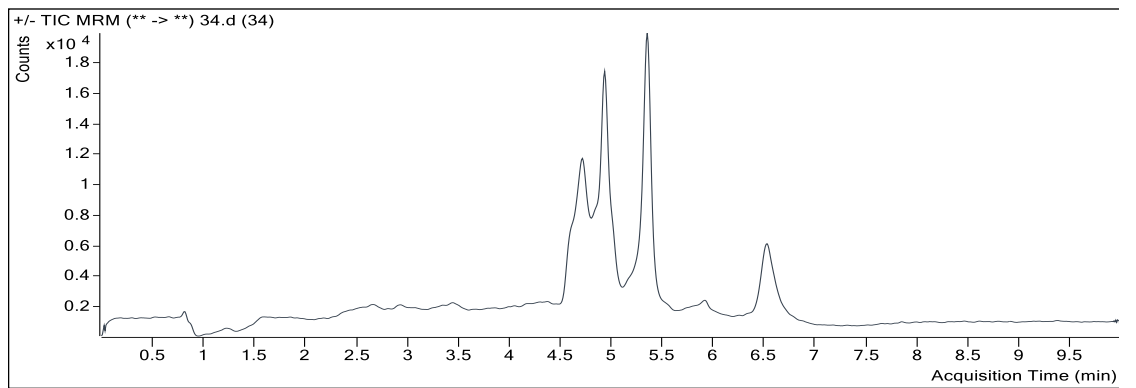
Ek Şekil 50: EVL UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



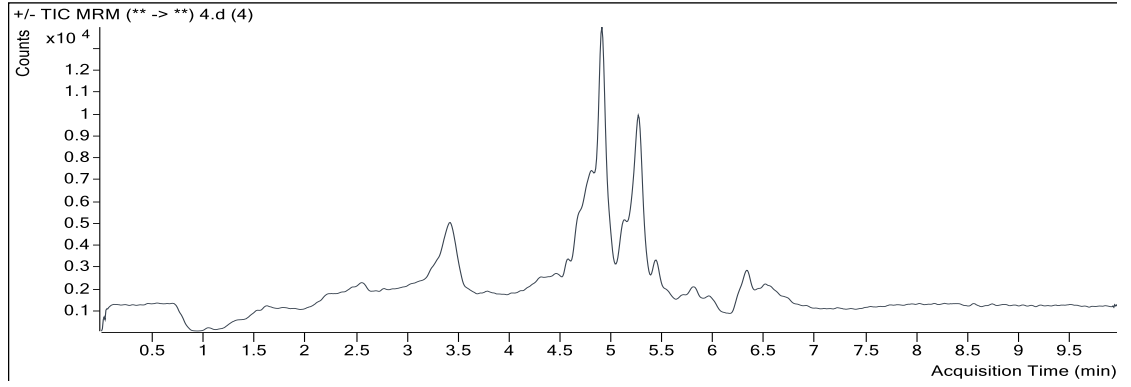
Ek Şekil 51: EVL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



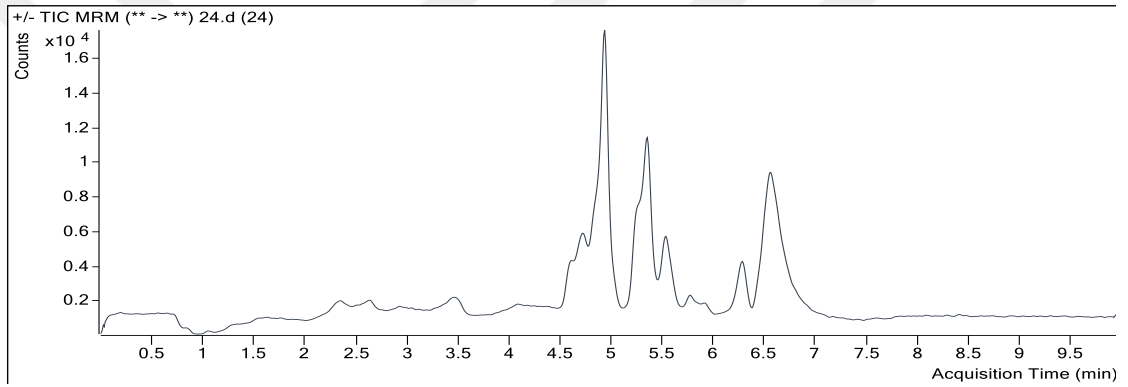
Ek 52: LTH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



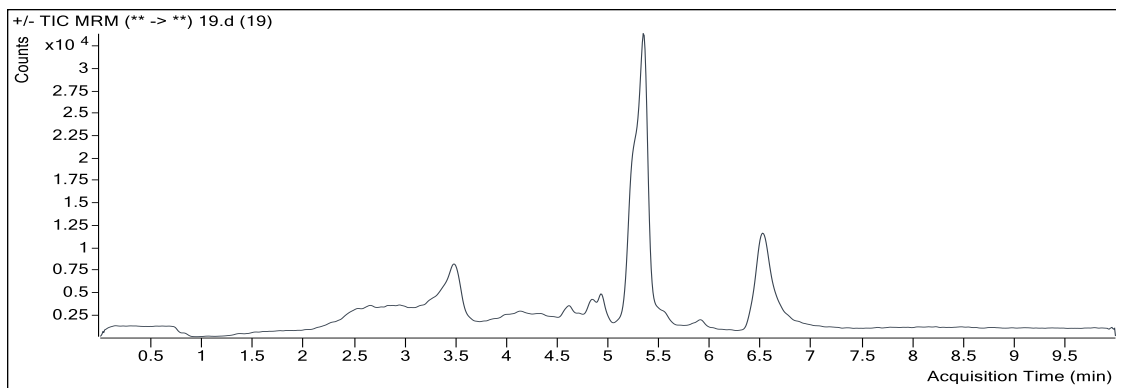
Ek Şekil 53: LTH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



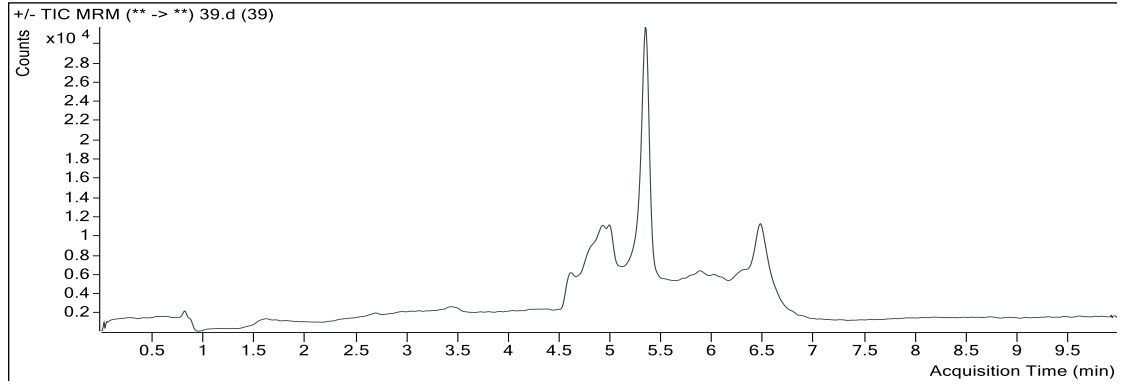
Ek Şekil 54: LTH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



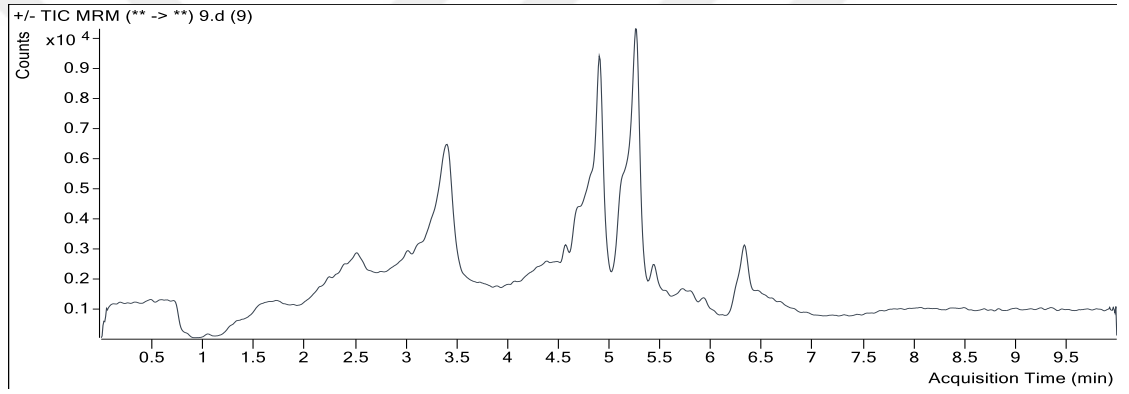
Ek Şekil 55. LTH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



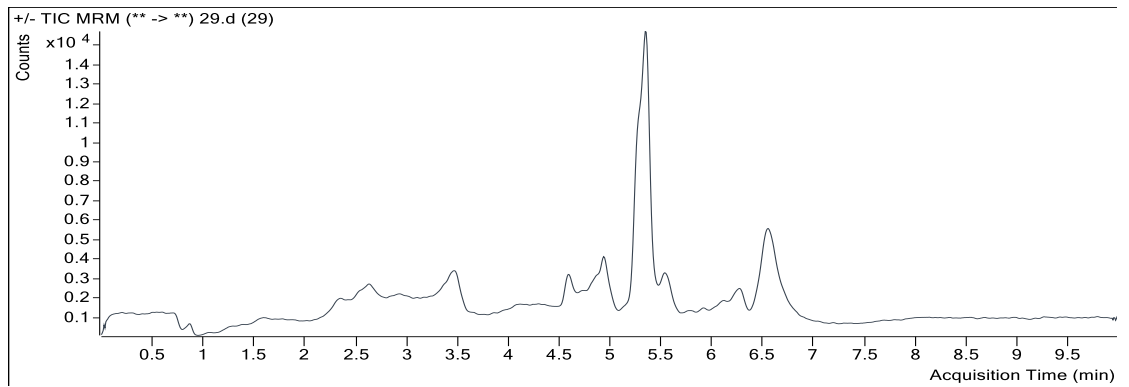
Ek Şekil 56: LTL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



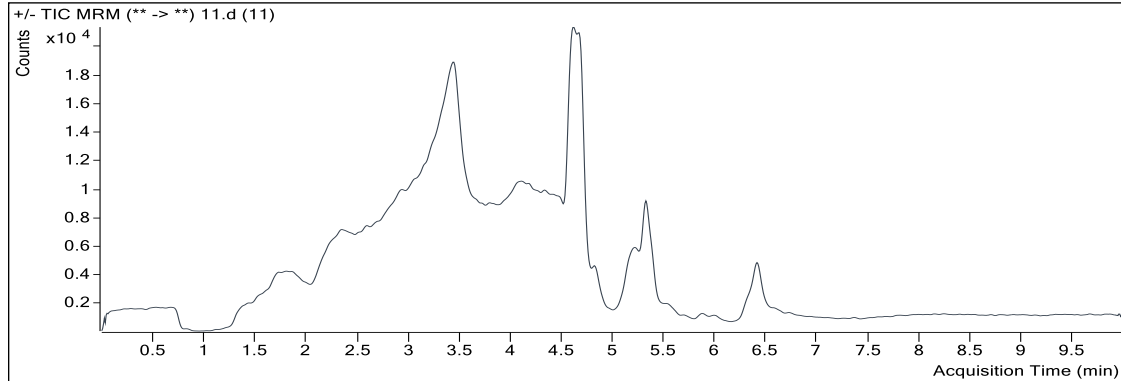
Ek Şekil 57: LTL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



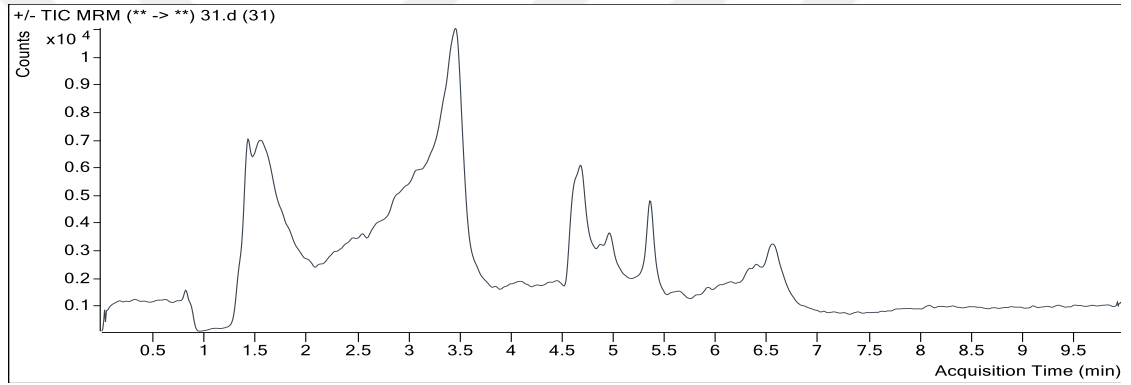
Ek Şekil 58. LTH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



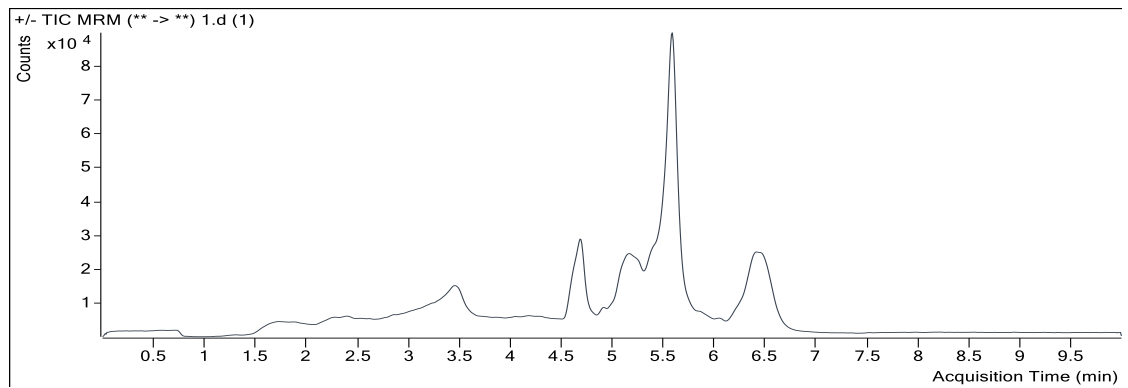
Ek Şekil 59: LTL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



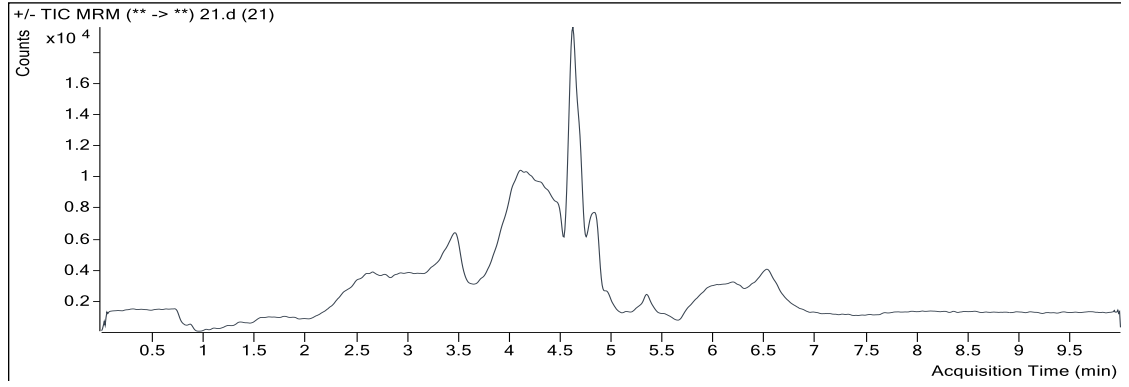
Ek Şekil 60: CFH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



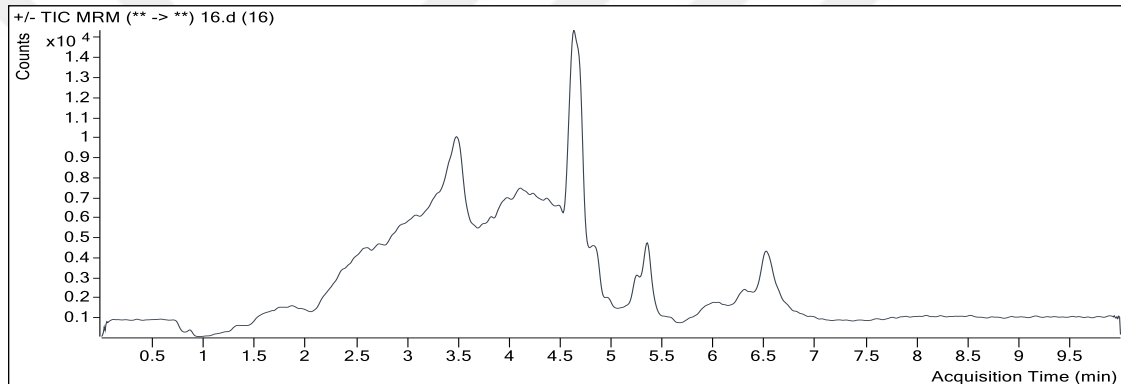
Ek Şekil 61: CFH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



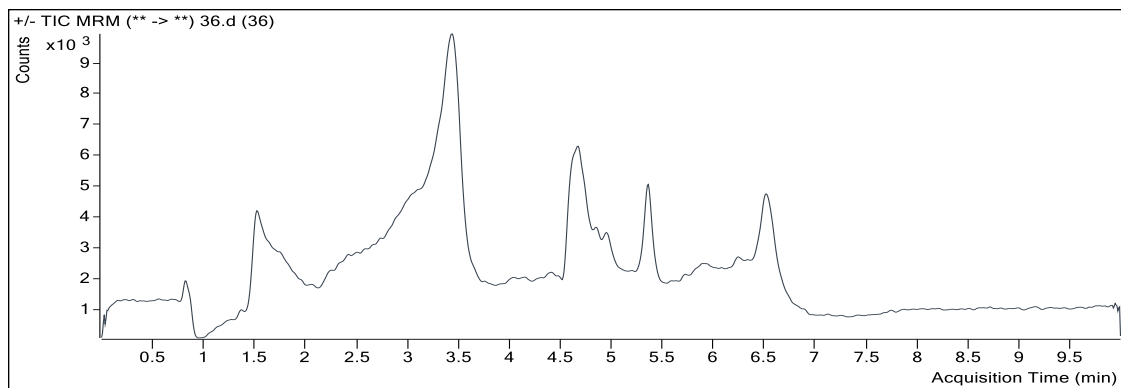
Ek Şekil 62: CFH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



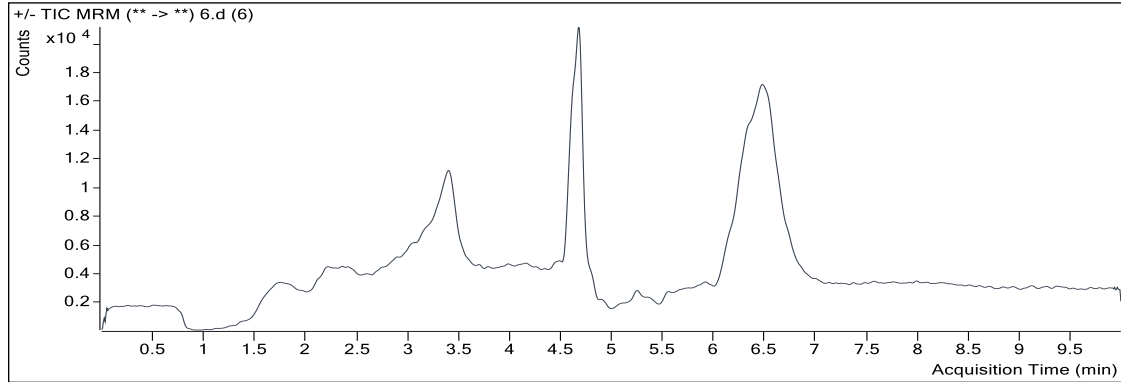
Ek Şekil 63: CFH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



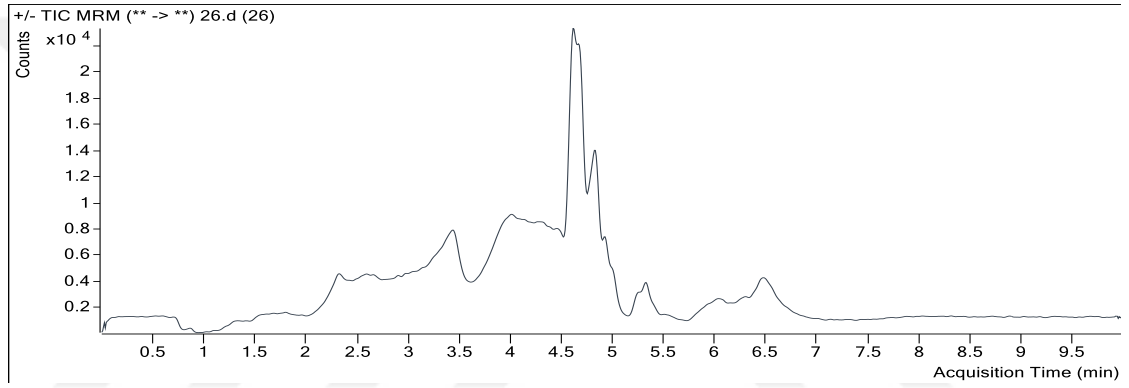
Ek Şekil 64: CFL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



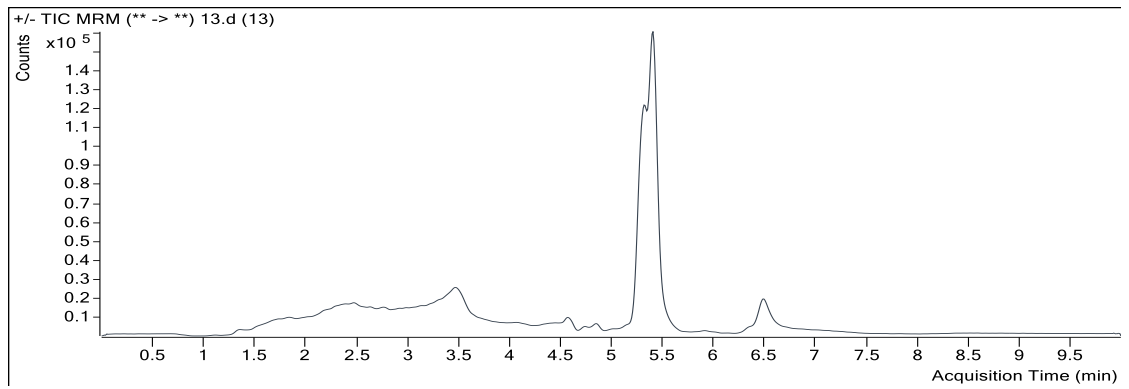
Ek Şekil 65: CFL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



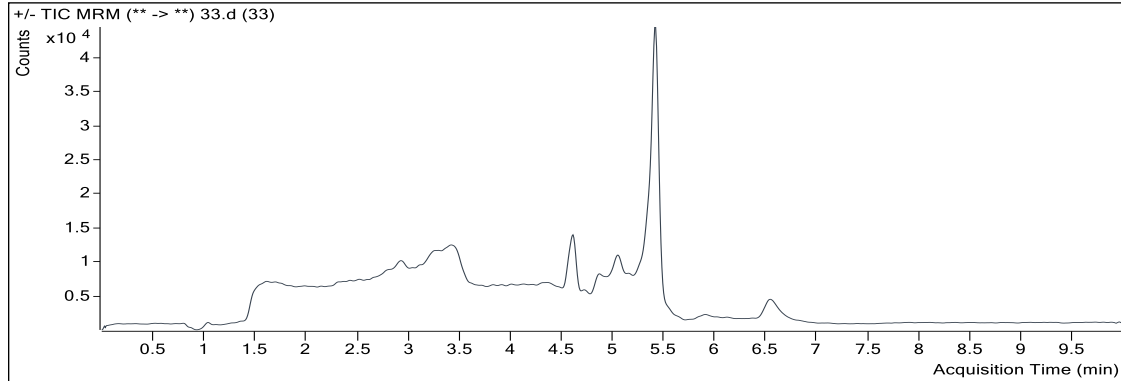
Ek Şekil 66: CFL UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



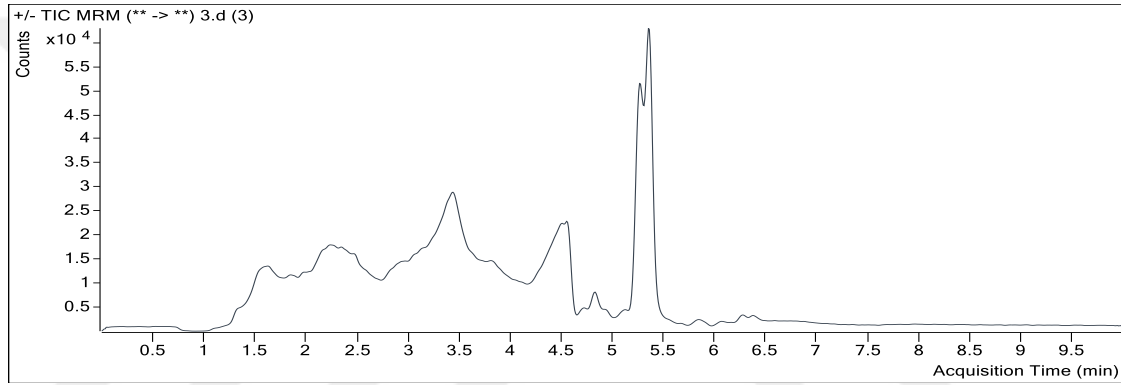
Ek Şekil 67: CFL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



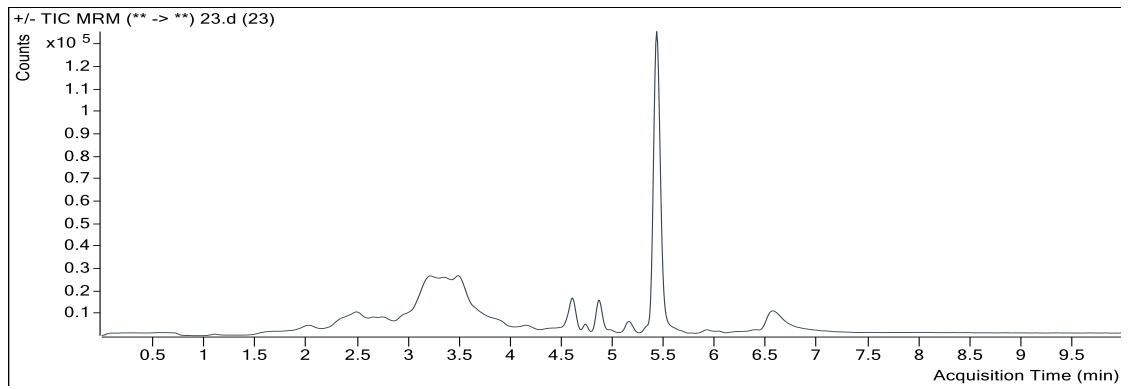
Ek Şekil 68: CPH SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



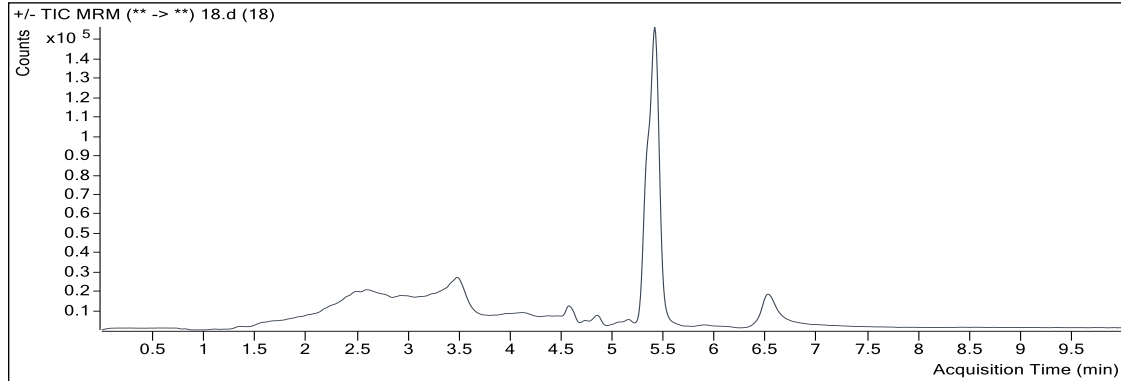
Ek Şekil 69: CPH SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



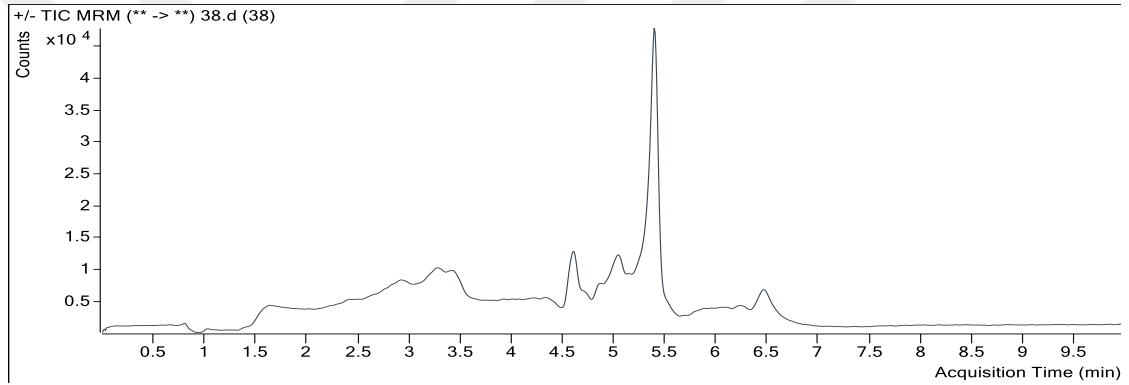
Ek Şekil 70: CPH UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



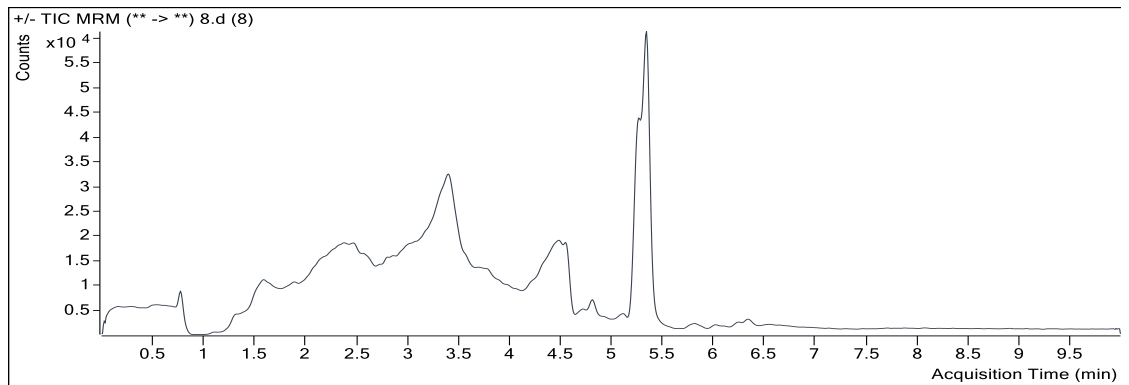
Ek Şekil 71: CPH ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



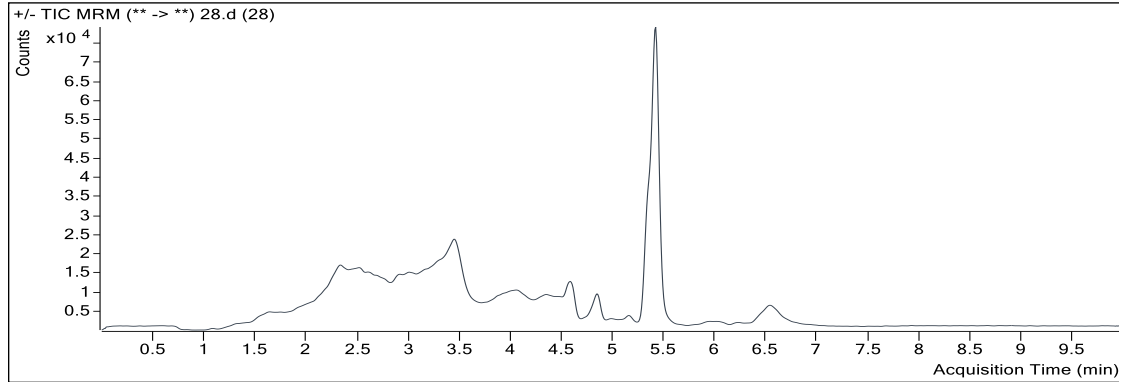
Ek Şekil 72: CPL SE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



Ek Şekil 73: CPL SEE ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı

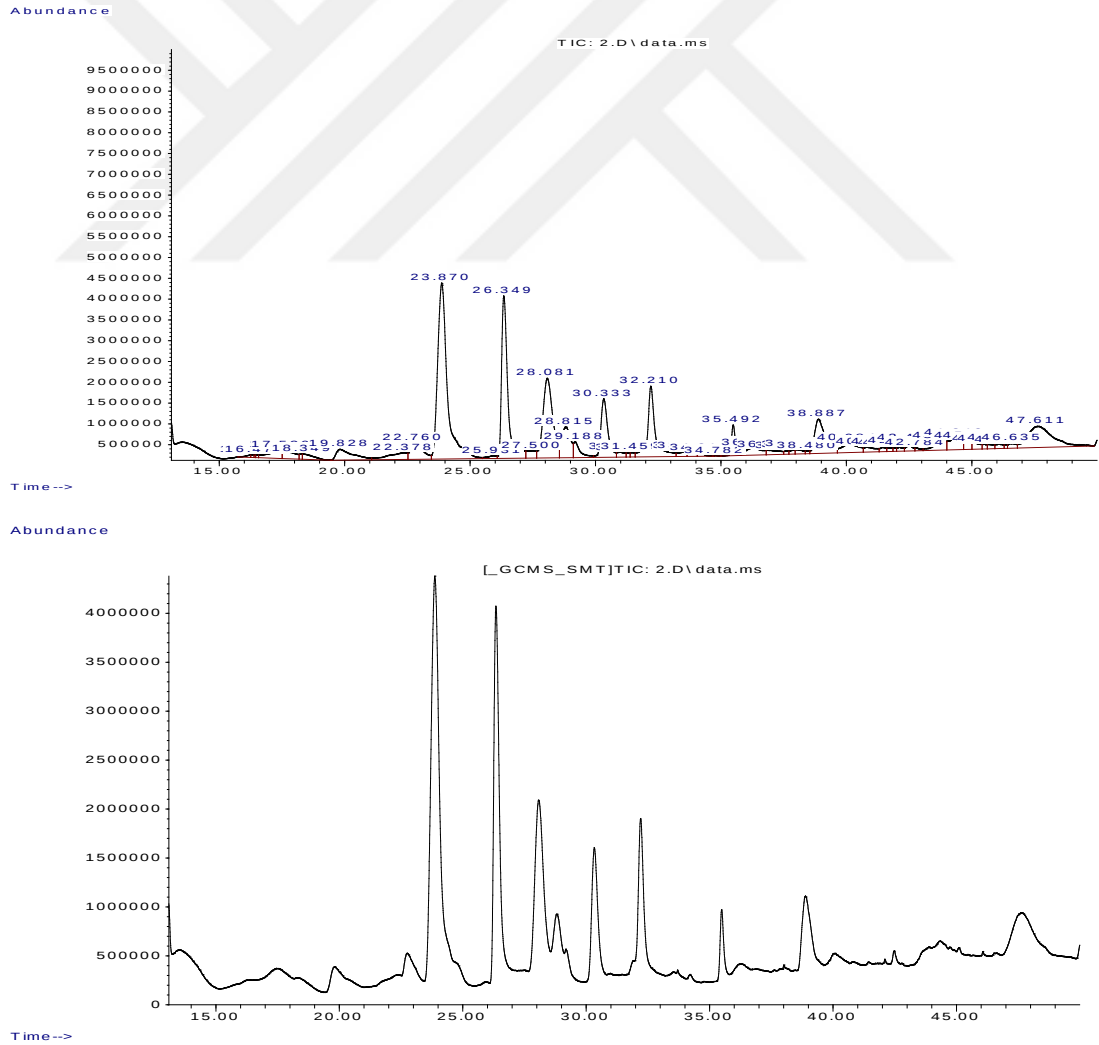


Ek Şekil 74: CPL UDE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı



Ek Şekil 75: CPL ASE E:S (1:1) ekstraktının LC-MS/MS metodu ile taranmasına ilişkin kromatogramı

Ek Şekil 76. devamı



Ek Şekil 76. devamı

Library Search Report						
Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\						
Data File : 2.D						
Acq On : 7 Aug 2019 16:29 (#1); 7 Aug 2019 16:16 (#2)						
Operator :						
Sample : 2						
Misc :						
ALS vial : 2 Sample Multiplier: 1						
Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80						
C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80						
C:\Database\W8N05ST.L						
Unknown Spectrum: Apex						
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e						
Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	16.280	0.20	C:\Database\Flavor3.L			
			53.54 DOCOSANE	109	000629-97-0	87
			59.33 TETRACOSANE	111	000646-31-1	83
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	83
2	16.371	0.03	C:\Database\Flavor3.L			
			62.00 PENTACOSANE	107	000629-99-2	90
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	86
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	83
3	16.423	0.05	C:\Database\Flavor3.L			
			62.00 PENTACOSANE	107	000629-99-2	91
			56.48 TRICOSANE	108	000638-67-5	90
			59.33 TETRACOSANE	111	000646-31-1	90
4	16.474	0.12	C:\Database\Flavor3.L			
			62.00 PENTACOSANE	107	000629-99-2	91
			56.48 TRICOSANE	108	000638-67-5	91
			59.33 TETRACOSANE	111	000646-31-1	91
5	17.458	1.32	C:\Database\Flavor3.L			
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	86
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	86
			53.54 DOCOSANE	109	000629-97-0	86
6	17.527	1.22	C:\Database\Flavor3.L			
			43.92 NONADECANE	104	000629-92-5	90
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	86
			62.00 PENTACOSANE	107	000629-99-2	86
7	19.827	2.28	C:\Database\Famedb23.L			
			C 14:0	8	000124-10-7	96
			C 16:0	12	000112-39-0	50
			C 12:0	6	000111-82-0	47
8	22.379	1.69	C:\Database\Flavor3.L			
			56.48 TRICOSANE	108	000638-67-5	87
			59.33 TETRACOSANE	111	000646-31-1	86
			62.00 PENTACOSANE	107	000629-99-2	86
9	22.763	2.47	C:\Database\W8N05ST.L			
			Benzaldehyde, 2,4-dimethyl- \$ 2,4-	275013	015764-16-6	89
			Dimethylbenzaldehyde \$ 2,4-Dimethy			
			lbenzenecarboxaldehyde			
			Benzaldehyde, 3,5-dimethyl- \$ 3,5-	275001	005779-95-3	64
			Dimethylbenzaldehyde #			
10	23.873	21.95	BENZOIC ACID, 3,5-DIMETHYL-, METHY	273825	025081-39-4	60
			L ESTER \$ 3,5-DIMETHYLBENZOIC ACID			
			METHYL ESTER \$ METHYL 3,5-DIMETHY			
			LBENZOATE \$ 3,5-(CH3)2-C6H3-COOCH3			
11	25.933	0.31	C:\Database\Famedb23.L			
			C 17:0	14	001731-92-6	91
			C 10:0	4	000110-42-9	18
			C 11:0	5	001731-86-8	15
12	26.350	12.80	C:\Database\W8N05ST.L			
			Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	383416	000096-76-4	95
			- \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2,			
			4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t-			
			Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter			
			t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3			
			3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$			
			2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol			
			PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)	382339	000096-76-4	94
			- \$ 2,4-DITERT-BUTYLPHENOL \$ 1-HYD			
			ROXY-2, 4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 1			
			-HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE			
			\$ 2,4 DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ 2,4-BI			
			S(1,1-DIMETHYLETHYL)PHENOL \$ 2,4-B			
			IS(TERT-BUTYL)-PHENOL \$ 2,4-BIS(TE			
			RT-BUTYL)PHENOL \$			

Ek Şekil 76. devamı

13	27.500	0.84	C:\Database\W8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane 74558 000646-31-1 83 PHENOL, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$ 382347 026746-38-3 64 DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ PHENOL, DI-T ERT-BUTYL- HEPTACOSANE \$ AI3-36283 \$ EINECS 2 70030 000593-49-7 64 09-792-4 \$ N-HEPTACOSANE
14	28.084	9.93	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 16 000112-61-8 98 C 14:0 8 000124-10-7 91 C 15:0 10 007132-64-1 59
15	28.817	3.45	C:\Database\Famedb23.L C 18:1(cis - 9) (omega 9) 18 000112-62-9 99 C 18:1 (trans - 9) (omega 9) 17 001937-62-8 99 C 16:1 (cis - 9) 13 001120-25-8 58
16	29.188	1.32	C:\Database\W8N05ST.L 2,1-BENZISOXAZOLE, 6-CHLORO-3-(2-T 435071 999435-07-9 25 HIENYL)- \$ 6-CHLORO-3-(2-THIENYL)- 2,1-BENZISOXAZOLE 3-(2-Methyl-6-methoxyphenyl)-4(3H) 435751 052898-73-4 20 -quinazolinone \$ 3-(2-Methoxy-6-me thylphenyl)-4(3H)-quinazolinone # Acetamide, 2-(3-cyano-4-methoxymet 435864 999435-87-2 15 hyl-6-methylpyridin-2-ylsulfanyl)- N-(4-methoxyphenyl)-
17	30.333	5.08	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 19 002566-97-4 99 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) 20 000112-63-0 99
18	30.985	0.40	C:\Database\W8N05ST.L Tetradecane, 2,6,10-trimethyl- \$ 2 73542 014905-56-7 80 ,6,10-Trimethyltetradecane TETRADECANE, 2,6,10-TRIMETHYL- \$ 2 67864 014905-56-7 80 ,6,10-TRIMETHYLTETRADECANE Pentadecane, 2-methyl- \$ 2-Methylp 36542 001560-93-6 42 entadecane
19	31.254	0.29	C:\Database\W8N05ST.L 4,5, ALPHA.-EPOXY-3-METHOXY-17-METH 523785 085454-97-3 83 YL-7, ALPHA.-(4-PHENYL-1,3-BUTADIEN YL)-6, BETA., 7, BETA.-(OXYMETHYLENE) MORPHTNAN
20	32.210	7.18	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) 22 000301-00-8 99 (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) 29 055682-88-7 90 C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6) 27 001783-84-3 38
21	33.537	0.49	C:\Database\W8N05ST.L 2-Bromo dodecane \$ Dodecane, 2-bro 73652 013187-99-0 41 mo- Heptadecane \$ n-Heptadecane \$ Norm 73556 000629-78-7 38 al-heptadecane DECANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLDECANE 65519 006975-98-0 38 \$ 2-METHYL-DECANE \$ DECANE, 2-MET HYL- (8CI)(9CI) \$ EINECS 230-236-1 \$ N-C8H17CH(CH3)2 \$ NSC 20567
22	33.709	0.37	C:\Database\W8N05ST.L 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 83151 000301-02-0 52 \$ Oleamide \$ Oleic acid amide \$ O leyl amide \$ Slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ A mide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit O 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliph atic amide \$ Armid O \$ cis-9,10-oc tadecenoamide \$ C Octadecanamide \$ Stearamide \$ Adog 83162 000124-26-5 47 en 42 \$ Octadecamide \$ Octadecylam ide \$ Stearic acid amide \$ Stearic amide \$ Stearoylamide \$ Stearoyla mine \$ Stearylamine \$ kemamide S \$ Armid 18 \$ Advawax 290 \$ Amide T \$ Crodamide S \$ Crodamide S, SR \$ Petrac vyn-eze \$ HEXADECANE, 8-HEXYL-8-PENTYL- \$ 8- 70027 055282-29-6 45 HEXYL-8-PENTYLHEXADECANE # \$ 8-HEX YL-8-PENTYLHEXADECANE \$ 8-N-PENTYL -8-N-HEXYLHEXADECANE
23	34.212	0.25	C:\Database\W8N05ST.L CURAN, 1-ACETYL-16,17,19,20-TETRAD 28461 056053-16-8 35 EHYDRO- \$ (19Z)-1-ACETYLCURA-16,19 -DIEN # \$ (19Z)-1-ACETYLCURA-16,19 -DIEN

Ek Şekil 76. devamı

24	35.494	1.54	C:\Database\w8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYDROXYPHENYL) PROPIONATE Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester \$ Methyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate \$ Methyl 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxyphenyl)propanoate # 3,4-DIHYDRO-7,12-DIHYDROXY-7,12-DI-METHYLBENZ[A]ANTHRACENE	469837	000000-00-0	98
				470255	006386-38-5	95
				469841	000000-00-0	90
25	36.272	1.26	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 C 11:0 C 10:0	30 5 4	000929-77-1 001731-86-8 000110-42-9	95 38 38
26	36.896	0.83	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 53.54 DOCOSANE 36.74 HEPTADECANE	111 109 102	000646-31-1 000629-97-0 000629-78-7	87 59 59
27	37.617	0.18	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 53.54 DOCOSANE 47.33 EICOSANE	107 109 105	000629-99-2 000629-97-0 000112-95-8	93 86 86
28	37.869	0.23	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 56.48 TRICOSANE	111 107 108	000646-31-1 000629-99-2 000638-67-5	93 90 81
29	38.012	0.37	C:\Database\Flavor3.L 47.33 EICOSANE 36.74 HEPTADECANE 50.47 HENEICOSANE	105 102 110	000112-95-8 000629-78-7 000629-94-7	83 80 72
30	38.887	4.72	C:\Database\w8N05ST.L 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 \$ Oleamide \$ Oleic acid amide \$ Oleyl amide \$ slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ Amide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit O 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliphatic amide \$ Armid O \$ cis-9,10-Octadecenoamide \$ C 9-OCTADECENAMIDE \$ OELSAEUREAMID 9-OCTADECENAMIDE \$ 9-OCTADECENAMID	83152 81670 81667	000301-02-0 999081-67-2 000301-02-0	99 98 98
31	40.083	1.81	C:\Database\Famedb23.L C 24:0 C 10:0 C 16:0	35 4 12	002442-49-1 000110-42-9 000112-39-0	97 38 32
32	40.833	0.62	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 53.54 DOCOSANE	111 107 109	000646-31-1 000629-99-2 000629-97-0	89 76 59
33	41.439	0.35	C:\Database\w8N05ST.L NONADECANE \$ AI3-36122 \$ EINECS 211-116-8 \$ N-NONADECANE \$ NSC 77136 DECANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLDECANE \$ 2-METHYL-DECANE \$ DECANE, 2-METHYL- (8CI)(9CI) \$ EINECS 230-236-1 \$ N-C8H17CH(CH3)2 \$ NSC 20567 Tetracosane \$ n-Tetracosane	68442 21359 74546	000629-92-5 006975-98-0 000646-31-1	89 89 89
34	42.109	0.66	C:\Database\w8N05ST.L HEXACOSANE \$ EINECS 211-124-1 \$ N-HEXACOSANE \$ NSC 122457 EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ AI3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ EINECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ NSC 62789 Tetracosane \$ n-Tetracosane	69894 68698 74546	000630-01-3 000112-95-8 000646-31-1	93 92 92
35	42.481	0.55	C:\Database\w8N05ST.L Cholestan-22(26)-isoepoxy Phosphoric acid, dibutyl 1,1-dimethyl-2,2,3,3-tetrafluoropropyl ester N-(4-CHLOROPHENYL)-N'-[2-(1-PIPERAZINYL)ETHYL]OXAMIDE \$ N-1~-(4-CHLOROPHENYL)-N-2~-[2-(1-PIPERAZINYL)ETHYL]ETHANEDIAMIDE	190766 190724 189418	999190-76-9 999190-72-7 330593-05-0	49 46 46
36	42.784	0.17	C:\Database\w8N05ST.L TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Tetracosane \$ n-Tetracosane 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL	69558 74559 93053	000646-31-1 000646-31-1 000000-00-0	95 95 93
37	43.888	1.39	C:\Database\w8N05ST.L Hexacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl hexacosanoate \$ Cerotic acid methyl ester	118228	005802-82-4	99

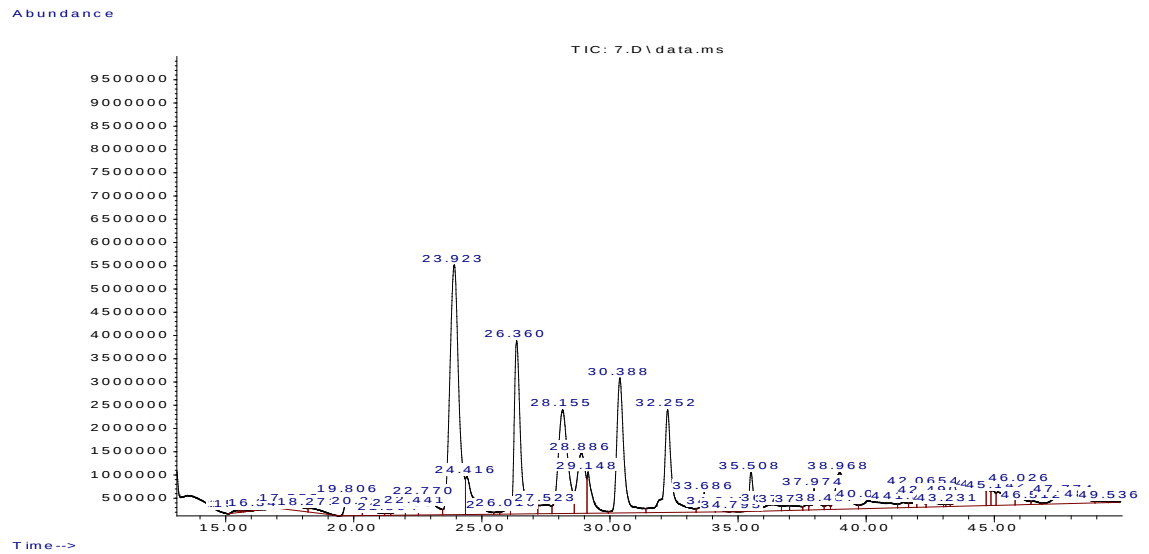
Ek Şekil 76. devamı

38	44.346	1.79	C:\Database\W8N05ST.L cholestan-3,22,26-triol triacetate 1,4-Epoxy naphthalene-1(2H)-methano	41849 74602	999041-85-1 056771-86-9	43 37
39	44.741	0.68	C:\Database\W8N05ST.L Imidazo[1,2-b][1,2,4-triazine, 6-(4 -methoxyphenyl)-7-methyl-2-phenyl- \$ Methyl 4-(7-methyl-2-phenylimid azo[1,2-b][1,2,4]triazin-6-yl)phen yl ether # 3-[3-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-acrylo yl]-6-methyl-pyran-2,4-dione \$ 3-[(2E)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-pro penoyl]-6-methyl-2H-pyran-2,4(3H)- dione #	493100 493054	094103-49-8 059144-91-1	53 49
40	45.107	0.67	C:\Database\W8N05ST.L 3-[3-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-acrylo yl]-6-methyl-pyran-2,4-dione \$ 3-[(2E)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-pro penoyl]-6-methyl-2H-pyran-2,4(3H)- dione #	493054	059144-91-1	41
41	45.473	0.26	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 28.82 PENTADECANE	107 111 100	000629-99-2 000646-31-1 000629-62-9	91 47 35
42	46.074	0.43	C:\Database\W8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2 11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Pentacosane \$ n-Pentacosane	93053 69555 74645	000000-00-0 000646-31-1 000629-99-2	76 70 70
43	46.635	0.58	C:\Database\W8N05ST.L PENTACOSANE \$ AI3-36478 \$ EINECS 2 11-123-6 \$ N-PENTACOSANE \$ NSC 158 663	69708	000629-99-2	89
44	47.613	6.89	C:\Database\W8N05ST.L Octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate OCTACOSANOIC ACID, METHYL ESTER \$ METHYL OCTACOSANOATE \$ EINECS 259- 754-6 \$ OCTACOSANSÆURE, METHYLEST ER	118236 117666	055682-92-3 055682-92-3	98 97

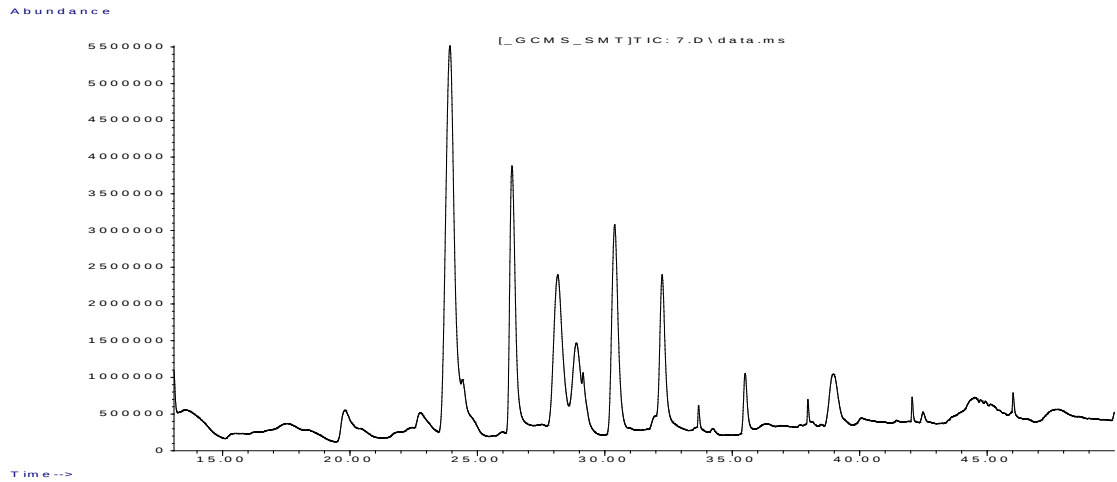
FAME 2019.M Fri Aug 09 08:15:18 2019

Ek Şekil 76: ARH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 77. devamı



Ek Şekil 77. devamı



Library Search Report

Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\
 Data File : 7.D
 Acq On : 7 Aug 2019 21:00 (#1); 7 Aug 2019 20:47 (#2)
 Operator :
 Sample : 7
 Misc :
 ALS Vial : 7 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\w8N05ST.L

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	15.490	0.21	C:\Database\w8N05ST.L Eicosane, 9-octyl- \$ 9-n-octyleico sane \$ 9-octyllicosane #	40563	013475-77-9	49
2	15.799	0.04	C:\Database\Flavor3.L 47.33 EICOSANE 43.92 NONADECANE 40.40 OCTADECANE	105 104 103	000112-95-8 000629-92-5 000593-45-3	96 95 93
3	17.556	2.33	C:\Database\Flavor3.L 43.92 NONADECANE 47.33 EICOSANE 50.47 HENEICOSANE	104 105 110	000629-92-5 000112-95-8 000629-94-7	90 86 86
4	18.334	0.71	C:\Database\Flavor3.L 43.92 NONADECANE 62.00 PENTACOSANE 53.54 DOCOSANE	104 107 109	000629-92-5 000629-99-2 000629-97-0	80 80 72
5	19.805	2.09	C:\Database\Famedb23.L C 14:0 C 10:0 C 16:0	8 4 12	000124-10-7 000110-42-9 000112-39-0	98 59 53
6	20.382	0.88	C:\Database\w8N05ST.L sulfurous acid, decyl hexyl ester sulfurous acid, hexyl tetradecyl e ster	146210 146271	999146-21-3 999146-27-4	50 50
7	21.990	0.51	C:\Database\Flavor3.L 47.33 EICOSANE 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE	105 111 107	000112-95-8 000646-31-1 000629-99-2	86 86 80

Ek Şekil 77. devamı

8	22.769	3.01	C:\Database\W8N05ST.L Benzaldehyde, 2,4-dimethyl- \$ 2,4- dimethylbenzaldehyde \$ 2,4-dimethy lbenzenecarboxaldehyde 3-BUTEN-2-OL, 4-(5-METHYL-2-THIEN YL)-, ACETATE \$ 4-(5-METHYL-2-THIEN YL)BUT-3-EN-2-YL ACETATE	275013	015764-16-6	78
9	23.924	21.00	C:\Database\Famedb23.L C 16:0 C 15:0 C 14:0	12 10 8	000112-39-0 007132-64-1 000124-10-7	98 81 72
10	24.416	3.09	C:\Database\W8N05ST.L 5-NITRO-DIHYDRO-SILAAZAANTHRONE 7,8-DIMETHOXY-1,2,4,5,10A,10B-HEXA HYDROBENZO(DE)-PYRROLO(3,2,1-13)QU INOLINE 5,5-DIMETHYL-7-NITRO[1]BENZOSILINO	453930 453890	000000-00-0 096165-84-3	38 35
11	26.013	0.41	C:\Database\Famedb23.L C 17:0 C 16:0 C 12:0	14 12 6	001731-92-6 000112-39-0 000111-82-0	95 16 16
12	26.362	10.60	C:\Database\W8N05ST.L Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,5-di-tert-butyl- \$ 2 ,5-di-tert-butylphenol Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t- Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	383389 383416	005875-45-6 000096-76-4	95 95
13	27.523	0.81	C:\Database\W8N05ST.L Heneicosane \$ n-Heneicosane \$ Heni cosane # DOCOSANE \$ C22H46 STANDARD \$ EINEC S 211-121-5 \$ N-DOCOSANE \$ NORMAL- DOCOSANE \$ NSC 77139	74197 69205	000629-94-7 000629-97-0	70 70
14	28.153	9.46	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 C 14:0 C 16:0	16 8 12	000112-61-8 000124-10-7 000112-39-0	98 93 64
15	28.885	4.57	C:\Database\Famedb23.L C 18:1 (trans - 9) (omega 9) C 18:1(cis - 9) (omega 9) C 16:1 (cis - 9)	17 18 13	001937-62-8 000112-62-9 001120-25-8	99 99 50
16	29.149	2.01	C:\Database\W8N05ST.L Pyridine-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)- \$ N'-Hyd roxy-N-[2-(trifluoromethyl)phenyl] -3-pyridinecarboximidamide # BENZOIC ACID, 2,4-BIS(TRIMETHYLSIL OXY)-, TRIMETHYLSILYL ESTER \$ BENZ OIC ACID, 2,4-BIS[(TRIMETHYLSILYL) OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER \$ TRIM ETHYLSILYL 2,4-BIS[(TRIMETHYLSILYL OXY)BENZOATE # \$.BETA.-RESORCYLI C ACID (TMS) \$ 2,4-BIS(TRIMETHYLSI LOXY)TRIMETHYLSIL	98117 507445	288246-53-7 010586-16-0	90 87
17	30.390	9.14	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	19 20 25	002566-97-4 000112-63-0 002463-02-7	99 99 90
18	32.250	7.48	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) C 18:3 (gamma) (all cis - 6,9,12) (omega 6)	22 29 21	000301-00-8 055682-88-7 002676-41-7	99 87 49
19	33.686	0.89	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORY L)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399	066564-08-7	90
20	34.241	0.22	C:\Database\W8N05ST.L Acetic acid, [3-(6-methoxy-2-benzo thiazolyl)-1,2,4-oxadiazol-5-ylmet hyl] ester	38533	999038-53-5	42
21	35.511	1.56	C:\Database\W8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUT YL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYD	469837	000000-00-0	99

Ek Şekil 77. devamı

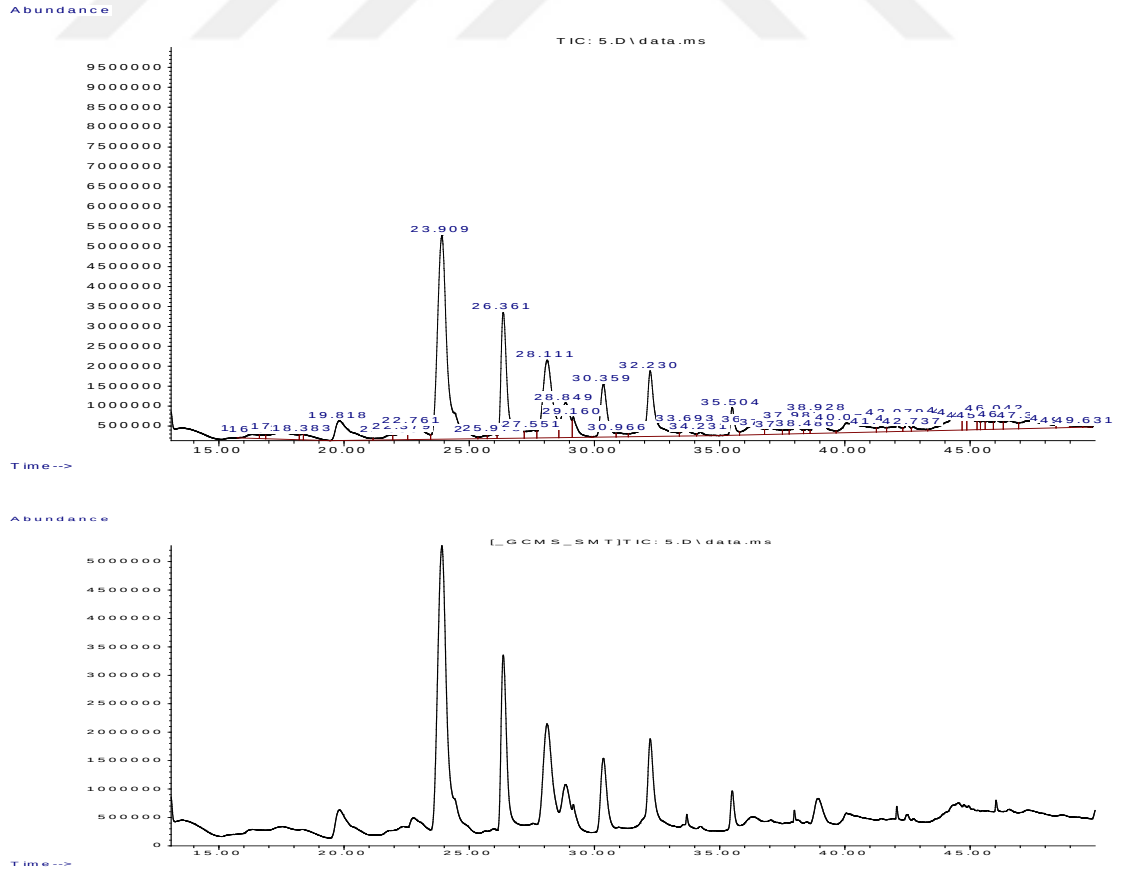
22	36.381	0.90	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 C 11:0 C 16:0	30 5 12	000929-77-1 001731-86-8 000112-39-0	95 10 9
23	36.919	0.31	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 36.74 HEPTADECANE 28.82 PENTADECANE	107 102 100	000629-99-2 000629-78-7 000629-62-9	90 76 59
24	37.045	0.45	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 36.74 HEPTADECANE 32.89 HEXADECANE	107 102 101	000629-99-2 000629-78-7 000544-76-3	80 59 59
25	37.680	0.22	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 36.74 HEPTADECANE	111 107 102	000646-31-1 000629-99-2 000629-78-7	92 62 53
26	37.972	0.87	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399	066564-08-7	91
27	38.487	0.21	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 36.74 HEPTADECANE 24.61 TETRADECANE	107 102 99	000629-99-2 000629-78-7 000629-59-4	83 72 72
28	38.967	3.66	C:\Database\w8N05ST.L 9-OCTADECENAMIDE \$ OELSAEUREAMID 9-OCTADECENAMIDE \$ 9-OCTADECENAMIDE E, (Z)- \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE # \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ (Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ 9-OCTADECENAMIDE, (9Z)- \$ 9-OCTADECENAMIDE, (Z)- (9CI) \$ 9-OCTADECENOIC ACID, AMIDE (CIS	81670 81667	999081-67-2 000301-02-0	99 99
29	40.078	1.70	C:\Database\Famedb23.L C 24:0	35	002442-49-1	91
30	41.445	0.41	C:\Database\w8N05ST.L EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ EINECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ NSC 62789 Tetracosane \$ n-Tetracosane DECANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLDECANE \$ 2-METHYL-DECANE \$ DECANE, 2-METHYL- (8CI) (9CI) \$ EINECS 230-236-1 \$ N-C8H17CH(CH3)2 \$ NSC 20567	68700 74546 21359	000112-95-8 000646-31-1 006975-98-0	95 90 90
31	42.063	0.81	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE CYCLODODECASILOXANE, TETRACOSAMETHYL- \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24,24-TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOXANE # \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24,24-TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOXANE \$ 2,2,4,4,6,6	507399 113164	066564-08-7 018919-94-3	93 55
32	42.492	0.66	C:\Database\w8N05ST.L Methanone, (1-hydroxycyclohexyl)phenyl- \$ 1-Hydroxycyclohexyl phenyl ketone \$ Irgacure 184 \$ (1-Hydroxycyclohexyl)(phenyl)methanone # N-(4-Bromo-3-methyl-phenyl)-N'-(2-piperazin-1-yl-ethyl)-oxalamide N-(4-Chlorophenyl)-N'-[2-(1-piperazinyl)ethyl]oxamide	190365 190746 190652	000947-19-3 999190-74-9 330593-05-0	50 49 49
33	44.518	2.97	C:\Database\w8N05ST.L 1-ISOPROPYL-2(METHOXYMETHOXY)-1,3-BUTADIENE IRON IODIDE COMPLEX I 2-METHOXY-4-METHYL-6-[(3',5'-DIMETHOXYPHENYL)METHYL]BENZOIC ACID	46955 70999 69289	000000-00-0 999071-00-1 000000-00-0	14 10 9
34	44.747	0.60	C:\Database\w8N05ST.L Eicosane, 10-heptyl-10-octyl- \$ 10-n-Heptyl-10-n-octyleicosane \$ 10-Heptyl-10-octyl-icosane #	75195	055470-98-9	43

35	44.935	0.59	C:\Database\W8N05ST.L 4-FORMYL-2,2,6,6'-TETRAMETHOXY-4'-METHYLBIPHENYL	492703	000000-00-0	42
36	45.141	1.51	C:\Database\W8N05ST.L 11,16-Bis-decyl-hexacosane \$ 11,16-Didecylhexacosane # BIS-O-(2,6,10,14-TETRAMETHYLHEXADECYL)TRIMETHYLSILYLGLYCEROL \$ BIS-O-(PHYTANYL)TRIMETHYLSILYLGLYCEROL IRON IODIDE COMPLEX I	75349 71054 70999	072936-28-8 000000-00-0 999071-00-1	25 23 10
37	46.028	0.89	C:\Database\W8N05ST.L silane, [[4-[[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethylsilyl]-5-silane, [[4-[[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis(trimethylsilyl)-5-4-(3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl)-2,2,7,7-tetramethyl-3,6-dioxa-2,7-disila	507648	056114-62-6	49
38	47.774	2.03	C:\Database\W8N05ST.L octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate OCTACOSANOIC ACID, METHYL ESTER \$ METHYL OCTACOSANOATE \$ EINECS 259-754-6 \$ OCTACOSANSAEURE, METHYLESTER	118236 118238 117666	055682-92-3 055682-92-3 055682-92-3	98 86 86
39	48.998	0.15	C:\Database\W8N05ST.L TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 TRIACONTANE \$ EINECS 211-349-5 \$ N-TRIACONTANE \$ NSC 158661	69555 70347	000646-31-1 000638-68-6	90 78
40	49.536	0.05	C:\Database\W8N05ST.L TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Tetracosane \$ n-Tetracosane TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298	69558 74559 69555	000646-31-1 000646-31-1 000646-31-1	95 95 95

FAME 2019.M Fri Aug 09 08:19:59 2019

Ek Şekil 77: ARL numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 78. devamı



Ek Şekil 78. devamı

Library Search Report

Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\
 Data File : 5.D
 Acq on : 7 Aug 2019 19:12 (#1); 7 Aug 2019 18:59 (#2)
 Operator :
 Sample : 5
 Misc :
 ALS Vial : 5 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\W8N05ST.L

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	16.331	0.46	C:\Database\Famedb23.L C 12:0 C 15:0 C 14:0	6 10 8	000111-82-0 007132-64-1 000124-10-7	86 27 27
2	16.537	0.10	C:\Database\W8N05ST.L TETRATRIACONTANE \$ AI3-36492 \$ EIN ECS 238-013-0 \$ N-TETRATRIACONTANE \$ NSC 2998 DODECANOIC ACID, METHYL ESTER \$ LA URIC ACID METHYL ESTER \$ METHYL DO DECANOATE \$ AI3-00669 \$ BRN 176778 O \$ DODECANOIC ACID METHYL ESTER \$ DODECANOIC ACID-METHYL ESTER \$ EI NECS 203-911-3 \$ FEMA NO. 2715 \$ F EMA NUMBER 2715 \$ HSDB 5550 \$ LAUR IC ACID, METHYL E Tetratriacontane \$ n-Tetratriacont ane	70648 117189 75175	014167-59-0 000111-82-0 014167-59-0	68 64 55
3	16.657	0.25	C:\Database\W8N05ST.L TETRADECANE \$ AI3-04240 \$ BRN 1733 859 \$ CCRIS 715 \$ EINECS 211-096-0 \$ HSDB 5728 \$ ISOTETRADECANE \$ N- TETRADECANE \$ NSC 72440 TETRATRIACONTANE \$ AI3-36492 \$ EIN ECS 238-013-0 \$ N-TETRATRIACONTANE \$ NSC 2998 Tetratriacontane \$ n-Tetratriacont ane	66779 70648 75175	000629-59-4 014167-59-0 014167-59-0	78 74 64
4	17.527	1.94	C:\Database\Flavor3.L 53.54 DOCOSANE 62.00 PENTACOSANE 56.48 TRICOSANE	109 107 108	000629-97-0 000629-99-2 000638-67-5	87 86 86
5	18.282	0.98	C:\Database\W8N05ST.L HEPTACOSANE \$ AI3-36283 \$ EINECS 2 09-792-4 \$ N-HEPTACOSANE Tetradecane \$ n-Tetradecane TETRADECANE \$ AI3-04240 \$ BRN 1733 859 \$ CCRIS 715 \$ EINECS 211-096-0 \$ HSDB 5728 \$ ISOTETRADECANE \$ N- TETRADECANE \$ NSC 72440	70030 72963 66805	000593-49-7 000629-59-4 000629-59-4	76 70 70
6	19.816	3.69	C:\Database\Famedb23.L C 14:0 C 16:0 C 12:0	8 12 6	000124-10-7 000112-39-0 000111-82-0	97 64 53
7	21.887	0.62	C:\Database\W8N05ST.L TETRATRIACONTANE \$ AI3-36492 \$ EIN ECS 238-013-0 \$ N-TETRATRIACONTANE \$ NSC 2998 HEXADECANE \$ AI3-06522 \$ BRN 17365 92 \$ CCRIS 5833 \$ CETANE \$ EINECS 208-878-9 \$ HEXADECAN \$ HSDB 6854 \$ ISOHEXADECANE \$ N-CETANE \$ N-HEX ADECANE \$ NSC 7334 HEXADECANE \$ AI3-06522 \$ BRN 17365 92 \$ CCRIS 5833 \$ CETANE \$ EINECS 208-878-9 \$ HEXADECAN \$ HSDB 6854 \$ ISOHEXADECANE \$ N-CETANE \$ N-HEX ADECANE \$ NSC 7334	70648 67530 67536	014167-59-0 000544-76-3 000544-76-3	90 89 89
8	22.379	1.00	C:\Database\Flavor3.L 53.54 DOCOSANE 56.48 TRICOSANE 50.47 HENEICOSANE	109 108 110	000629-97-0 000638-67-5 000629-94-7	87 87 86
9	22.763	2.29	C:\Database\W8N05ST.L Benzaldehyde, 3,5-dimethyl- \$ 3,5- Dimethylbenzaldehyde # BENZALDEHYDE, 4-ETHYL- \$ 4-ETHYLBE NZALDEHYDE \$ BENZALDEHYDE, P-ETHYL - \$ EBAL \$ EINECS 225-268-8 \$ ETHY L-BENZALDEHYDE \$ ETHYLBENZALDEHYDE - P- \$ FEMA NO. 3756 \$ P-ETHYL BENZ	275001 273649	005779-95-3 004748-78-1	60 53

Ek Şekil 78. devamı

10	23.907	25.10	C:\Database\Famedb23.L C 16:0 C 14:0 C 15:0	12 000112-39-0 98 8 000124-10-7 72 10 007132-64-1 59
11	25.978	0.62	C:\Database\Famedb23.L C 17:0 C 10:0 C 11:0	14 001731-92-6 89 4 000110-42-9 38 5 001731-86-8 25
12	26.362	10.14	C:\Database\w8N05ST.L Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- \$ 2 - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 - \$ 2,4-di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-tert-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- \$ 2 - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 - \$ 2,4-di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-tert-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$ 2 - \$ 2,4-DITERT-BUTYLPHENOL \$ 1-HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 1-HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 2,4-DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)PHENOL \$ 2,4-BIS(TERT-BUTYL)-PHENOL \$ 2,4-BIS(TERT-BUTYL)PHENOL \$	383370 000096-76-4 96 383416 000096-76-4 95 382339 000096-76-4 94
13	27.552	0.83	C:\Database\w8N05ST.L Docosane \$ n-Docosane \$ Normal-docosane DOCOSANE \$ C22H46 STANDARD \$ EINECS 211-121-5 \$ N-DOCOSANE \$ NORMAL-DOCOSANE \$ NSC 77139 Octacosane \$ n-Octacosane	74334 000629-97-0 97 69206 000629-97-0 97 74906 000630-02-4 68
14	28.113	9.42	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 C 14:0 C 16:0	16 000112-61-8 98 8 000124-10-7 59 12 000112-39-0 56
15	28.851	3.69	C:\Database\Famedb23.L C 18:1 (cis - 9) (omega 9) C 18:1 (trans - 9) (omega 9) C 15:1 (cis - 10)	18 000112-62-9 99 17 001937-62-8 99 11 090176-52-6 46
16	29.160	1.28	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE 9-OCTADECENOIC ACID (Z)-, METHYL ESTER \$ 9-OCTADECENOIC ACID, METHYL ESTER \$ METHYL (9Z)-9-OCTADECENOATE # \$ (Z)-9-OCTADECENOIC ACID METHYL ESTER \$ (Z)-9-OCTADECENOIC ACID, METHYL ESTER \$ 9-OCTADECENOIC ACID (9Z)-, METHYL ESTER \$ ADJ 100 \$ AI3-00651 \$ CCR 13-OCTADECENOIC ACID, METHYL ESTER \$ METHYL OCTADEC-13-ENOATE \$ METHYL (13E)-13-OCTADECENOATE # \$ METHYL (13E)-13-OCTADECENOATE	507399 066564-08-7 83 56438 000112-62-9 53 56458 056554-47-3 46
17	30.361	4.44	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	19 002566-97-4 99 20 000112-63-0 99 25 002463-02-7 90
18	30.968	0.45	C:\Database\w8N05ST.L Sulfurous acid, butyl octadecyl ester Nonahexacontanoic acid NONAHEXACONTANOIC ACID \$ N-NONAHEXACONTANOIC ACID	74879 999074-88-1 70 75415 040710-32-5 64 71153 040710-32-5 64
19	32.233	7.29	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	22 000301-00-8 99 29 055682-88-7 76 27 001783-84-3 25
20	33.692	0.87	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399 066564-08-7 90

Ek Şekil 78. devamı

21	34.229	0.30	C:\Database\w8N05ST.L Nonadecane, 1-chloro- \$ 1-Chlorono nadecane # 74253 062016-76-6 78 1-Chloroeicosane \$ Eicosane, 1-chl oro- \$ 1-Chloroicosane # 74379 042217-02-7 78 HEXADECANE, 7,9-DIMETHYL- \$ 7,9-DI METHYLHEXADECANE 68144 021164-95-4 60
22	35.505	1.44	C:\Database\w8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUT YL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYD ROXYPHENYL) PROPIONATE 469837 000000-00-0 98 Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1 -dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester \$ Methyl 3-(3,5-di-tert-but yl-4-hydroxyphenyl)propionate \$ Me thyl 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy phenyl)propanoate # 470255 006386-38-5 93 3,4-DIHYDRO-7,12-DIHYDROXY-7,12-DI METHYLBENZ[A]ANTHRACENE 469841 000000-00-0 90
23	36.318	1.81	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 30 000929-77-1 96 C 11:0 5 001731-86-8 30 C 10:0 4 000110-42-9 30
24	37.039	0.99	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 107 000629-99-2 80 47.33 EICOSANE 105 000112-95-8 53 43.92 NONADECANE 104 000629-92-5 53
25	37.674	0.33	C:\Database\Flavor3.L 56.48 TRICOSANE 108 000638-67-5 93 53.54 DOCOSANE 109 000629-97-0 90 50.47 HENEICOSANE 110 000629-94-7 72
26	37.989	0.87	C:\Database\w8N05ST.L Morphinan, 7,8-didehydro-4,5-epoxy -17-methyl-3,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, (5.alpha.,6.alpha.)- \$ Mor phine, bis(trimethylsilyl)- \$ Morp hine di-TMS derivative 115835 055449-66-6 90 1,3,3,3-TETRAMETHYLDISILOXANYL TRI S(TRIMETHYLSILYL) ORTHOSILICATE # 111706 038147-00-1 53 \$ 1,1,1,5,7,7-HEPTAMETHYL-3,3-BI S(TRIMETHYLSILOXY)TETRAILOXANE \$ 1,3,3,3-TETRAMETHYLDISILOXANYL TRI S(TRIMETHYLSILYL) ORTHOSILICATE
27	38.487	0.28	C:\Database\Flavor3.L 36.74 HEPTADECANE 102 000629-78-7 93 59.33 TETRACOSANE 111 000646-31-1 89 40.40 OCTADECANE 103 000593-45-3 64
28	38.927	2.56	C:\Database\w8N05ST.L 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 \$ Oleamide \$ Oleic acid amide \$ O leyl amide \$ Slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ A mide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit O 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliph atic amide \$ Armid O \$ cis-9,10-oc tadecenoamide \$ C 83152 000301-02-0 98 9-OCTADECENAMIDE \$ OELSAEUREAMID 9-OCTADECENAMIDE \$ 9-OCTADECENAMID E, (Z)- \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE # \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ (9Z)-9-O CTADECENAMIDE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ (Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ 9-O CTADECENAMIDE, (9Z)- \$ 9-OCTADECEN AMIDE, (Z)- (9CI) \$ 9-OCTADECENOIC ACID, AMIDE (CIS 81670 999081-67-2 97 81667 000301-02-0 97
29	40.072	2.64	C:\Database\w8N05ST.L TETRACOSANOIC ACID, METHYL ESTER \$ 117634 002442-49-1 68 LIGNOCERIC ACID METHYL ESTER \$ ME THYL TETRACOSANOATE \$ EINECS 219-4 75-2 \$ METHYL LIGNOCERATE \$ METHYL TETRACOSANOIC ACID \$ TETRACOSANOI C (24 : 0)ACID METHYL ESTER Tetracosanoic acid, methyl ester \$ 118224 002442-49-1 68 Methyl lignocerate \$ Methyl tetra cosanoate \$ Lignoceric acid methyl ester Tetracosanoic acid, methyl ester \$ 118222 002442-49-1 64 Methyl lignocerate \$ Methyl tetra cosanoate \$ Lignoceric acid methyl ester
30	41.462	0.50	C:\Database\w8N05ST.L HEXACOSANE \$ EINECS 211-124-1 \$ N- HEXACOSANE \$ NSC 122457 69894 000630-01-3 93 Octadecane, 3-methyl- \$ 3-Methyl oc tadecane 73909 006561-44-0 93 Heptadecane, 3-methyl- \$ 3-Methyl h eptadecane 73718 006418-44-6 93

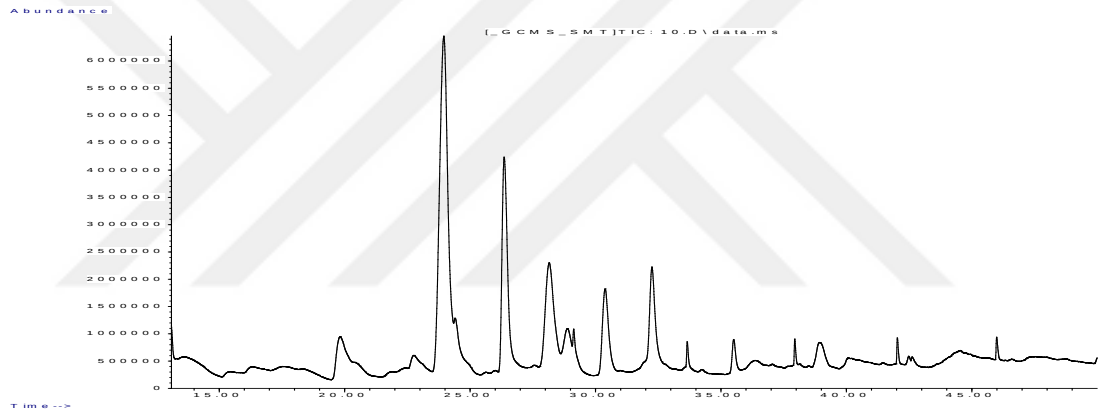
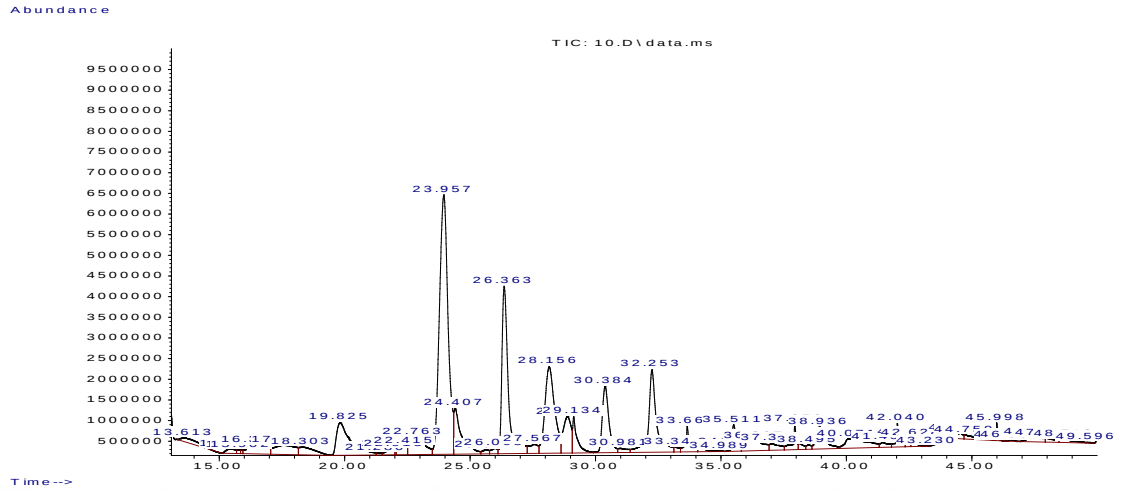
Ek Şekil 78. devamı

31	42.080	0.88	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399	066564-08-7	94
32	42.486	0.50	C:\Database\W8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane Hexanoic acid, but-3-yn-2-yl ester ISOTHIAZOLE, 4-METHYL- \$ 4-METHYLISOTHIAZOLE \$ 4-METHYL-1,2-THIAZOLE	74546 190129 188169	000646-31-1 999190-13-2 000693-90-3	93 70 58
33	42.738	0.37	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 50.47 HENEICOSANE 40.40 OCTADECANE	107 110 103	000629-99-2 000629-94-7 000593-45-3	83 40 40
34	44.535	2.91	C:\Database\W8N05ST.L (7A.ALPHA.,7B.BETA.,14B.ALPHA.,14C.BETA.)-5,6,7A,7B,9,10,14B,14C-OCTAHYDRODIBENZO[C,C']CYCLOBUTA[1,2-A:4,3-A']DICYCLOHEPTENE-7,8-DIONE	492797	071975-03-6	38
35	44.758	0.62	C:\Database\W8N05ST.L 4H-1-BENZOPYRAN-4-ONE, 5,6,8-TRIHYDROXY-2-(4-HYDROXYPHENYL)-7-METHOXY- \$ DEMETHYLTHYMUSIN 3-[3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-acryloyl]-6-methyl-pyran-2,4-dione \$ 3-[(2E)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propenoyl]-6-methyl-2H-pyran-2,4(3H)-dione #	492667 493054	098755-26-1 059144-91-1	38 37
36	44.941	1.40	C:\Database\W8N05ST.L 4H-1-Benzopyran-4-one, 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- \$ Flavone, 3,4',5,7-tetrahydroxy-3'-methoxy- \$ C.I. 75680 \$ Isorhamnetin \$ Isorhamnetol \$ Quercetin 3'-Methyl ether \$ 3,4',5,7-Tetrahydroxy-3'-methoxyflavone \$ 3'-Methoxyquercetin \$ 3' (7A.ALPHA.,7B.BETA.,14B.ALPHA.,14C.BETA.)-5,6,7A,7B,9,10,14B,14C-OCTAHYDRODIBENZO[C,C']CYCLOBUTA[1,2-A	493107 492797	000480-19-3 071975-03-6	53 53
37	45.519	0.41	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 15.77 DODECANE	107 111 97	000629-99-2 000646-31-1 000112-40-3	95 86 50
38	45.696	0.70	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 20.19 TRIDECANE	111 107 98	000646-31-1 000629-99-2 000629-50-5	83 83 41
39	46.040	0.93	C:\Database\W8N05ST.L CYCLODODECASILOXANE, TETRACOSAMETHYL- \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24,24-TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOXANE # \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24,24-TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOXANE \$ 2,2,4,4,6,6	113164	018919-94-3	46
40	46.560	1.10	C:\Database\W8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane HEXACOSANE \$ EINECS 211-124-1 \$ N-HEXACOSANE \$ NSC 122457 1-Chloroeicosane \$ Eicosane, 1-chloro- \$ 1-Chloroeicosane #	74546 69894 74379	000646-31-1 000630-01-3 042217-02-7	83 66 60
41	47.316	2.31	C:\Database\W8N05ST.L 1,4-METHANOAZULEN-9-OL, DECAHYDRO-1,5,5,8A-TETRAMETHYL-, [1R-(1.ALPHA.,3A.BETA., \$ 1,4-METHANOAZULEN-9-OL, DECAHYDRO-1,5,5,8A-TETRAMETHYL-, [1R-(1.ALPHA.,3A.BETA.,4.ALPHA.,8A.BETA.,9S*)]- \$ 1,4-METHANOAZULEN-9-OL, DECAHYDRO-1,5,5,8A-TETRAMETHYL-,	10509	000465-24-7	87
42	48.637	0.70	C:\Database\W8N05ST.L TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Tetracosane \$ n-Tetracosane	69555 69558 74559	000646-31-1 000646-31-1 000646-31-1	95 90 90

FAME 2019.M Fri Aug 09 08:18:19 2019

Ek Şekil 78: EVH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 79. devamı



Library Search Report

Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\
 Data File : 10.D
 Acq On : 7 Aug 2019 23:43 (#1); 7 Aug 2019 23:30 (#2)
 Operator :
 Sample : 10
 Misc :
 ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\W8N05ST.L

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	13.613	0.78	C:\Database\Flavor3.L			
			53.54 DOCOSANE	109	000629-97-0	87
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	87
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	87
2	15.467	0.41	C:\Database\W8N05ST.L			
			ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINY)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399	066564-08-7	53
3	15.719	0.13	C:\Database\W8N05ST.L			
			3,11-DIMETHYL-NONACOSANE	70437	000000-00-0	50
			Eicosane, 9-octyl- \$ 9-n-octyleicosane \$ 9-octylleicosane #	40563	013475-77-9	47
4	16.331	1.77	C:\Database\Famedb23.L			
			C 12:0	6	000111-82-0	95
			C 15:0	10	007132-64-1	38
			C 16:0	12	000112-39-0	32
5	17.533	2.01	C:\Database\Flavor3.L			
			40.40 OCTADECANE	103	000593-45-3	90
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	80
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	80

Ek Şekil 79. devamı

6	18.305	1.31	C:\Database\w8N05ST.L PENTADECANE \$ BRN 1698194 \$ CH3(CH 2)13CH3 \$ EINECS 211-098-1 \$ HSDB 5729 \$ N-PENTADECANE \$ NSC 172781 Heptacosane \$ n-Heptacosane PENTACOSANE \$ AI3-36478 \$ EINECS 2 11-123-6 \$ N-PENTACOSANE \$ NSC 158 663	67194 000629-62-9 83 74839 000593-49-7 64 69708 000629-99-2 64
7	19.827	5.32	C:\Database\Famedb23.L C 14:0 C 13:0 C 11:0	8 000124-10-7 98 7 001731-88-0 59 5 001731-86-8 58
8	21.939	0.55	C:\Database\w8N05ST.L TETRATRIACONTANE \$ AI3-36492 \$ EIN ECS 238-013-0 \$ N-TETRATRIACONTANE \$ NSC 2998 Pentadecane \$ n-Pentadecane \$ CH3(CH2)13CH3 Heneicosane \$ n-Heneicosane \$ Heni cosane #	70648 014167-59-0 74 73159 000629-62-9 60 74197 000629-94-7 58
9	22.414	0.73	C:\Database\Flavor3.L 50.47 HENEICOSANE 62.00 PENTACOSANE 47.33 EICOSANE	110 000629-94-7 91 107 000629-99-2 86 105 000112-95-8 72
10	22.763	2.48	C:\Database\w8N05ST.L BENZALDEHYDE, 3,4-DIMETHYL- \$ 3,4- DIMETHYLBENZALDEHYDE \$ EINECS 227- 770-2 Benzaldehyde, 3,4-dimethyl- \$ 3,4- Dimethylbenzaldehyde	273654 005973-71-7 55 275014 005973-71-7 55
11	23.959	23.52	C:\Database\Famedb23.L C 16:0 C 14:0 C 15:0	12 000112-39-0 98 8 000124-10-7 72 10 007132-64-1 59
12	24.405	3.82	C:\Database\w8N05ST.L 5-NITRO-DIHYDRO-SILAAZAANTHRONE 5,5-DIMETHYL-7-NITRO[1]BENZOSILINO [3,2-C]PYRIDIN-10(5H)-ONE # \$ 5,5- DIMETHYL-7-NITRO[1]BENZOSILINO[3,2 -C]PYRIDIN-10(5H)-ONE \$ 5,5-DIMETH YL-7-NITRO[1]BENZOSILINO[3,2-C]PYR IDIN-10(5H)-ONE (COMPUTER-GENERATE D NAME) \$ 5-NITRO-10,10-DIMETHYL-9 ,10-DIHYDRO-10-SI	453930 000000-00-0 46 453929 099506-33-9 38
13	25.630	0.25	C:\Database\w8N05ST.L HEPTADECANE \$ AI3-36898 \$ BRN 1738 898 \$ EINECS 211-108-4 \$ HEPTADECA N \$ N-HEPTADECANE \$ NORMAL-HEPTADE CANE \$ NSC 172782 PENTADECANE \$ BRN 1698194 \$ CH3(CH 2)13CH3 \$ EINECS 211-098-1 \$ HSDB 5729 \$ N-PENTADECANE \$ NSC 172781 HEXATRIACONTANE \$ AI3-52389 \$ EINE CS 211-127-8 \$ N-HEXATRIACONTANE \$ NOR-HEXATRIACONTANE \$ NSC 407536	25969 000629-78-7 84 67194 000629-62-9 52 70750 000630-06-8 50
14	26.007	0.33	C:\Database\Famedb23.L C 17:0 C 16:0 C 15:0	14 001731-92-6 94 12 000112-39-0 25 10 007132-64-1 25
15	26.362	11.10	C:\Database\w8N05ST.L Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t- Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85x \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t- Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85x \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	383370 000096-76-4 96 383416 000096-76-4 95
16	27.569	0.82	C:\Database\w8N05ST.L PHENOL, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$ DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ PHENOL, DI-T ERT-BUTYL- DECANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLDECANE \$ 2-METHYL-DECANE \$ DECANE, 2-MET HYL- (8CI)(9CI) \$ EINECS 230-236-1 \$ N-C8H17CH(CH3)2 \$ NSC 20567	382347 026746-38-3 78 21359 006975-98-0 64
17	28.159	8.80	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 C 14:0 C 16:0	16 000112-61-8 99 8 000124-10-7 93 12 000112-39-0 64

Ek Şekil 79. devamı

18	28.880	2.91	C:\Database\Famedb23.L C 18:1(cis - 9) (omega 9) C 18:1 (trans - 9) (omega 9) C 15:1 (cis - 10)	18 000112-62-9 99 17 001937-62-8 99 11 090176-52-6 62
19	29.131	1.62	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2 E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE 6-AZA-5,7,12,14-TETRATHIAPENTACENE BENZOIC ACID, 2,6-BIS(TRIMETHYLSIL	507399 066564-08-7 89 507397 000000-00-0 59 110760 003782-85-2 46
20	30.384	4.38	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	19 002566-97-4 99 20 000112-63-0 99 25 002463-02-7 91
21	30.980	0.11	C:\Database\W8N05ST.L 1-OCTADECENE \$ OCTADEC-1-ENE \$.AL PHA.-OCTADECENE \$ AI3-06521 \$ ALPH A-OCTADECENE \$ EINECS 204-012-9 \$ NEODENE 18 \$ NSC 66460 \$ OCTADECEN E-1 \$ OCTADECYLENE .ALPHA.- \$ OCTA DECYLENE ALPHA- \$ OCTADECYLENE,	68102 000112-88-9 70
22	32.256	6.24	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	22 000301-00-8 99 29 055682-88-7 90 27 001783-84-3 38
23	33.182	0.17	C:\Database\W8N05ST.L Heneicosane \$ n-Heneicosane \$ Heni cosane # HENEICOSANE \$ HENICOSANE \$ HENICOS ANE # \$ AI3-36479 \$ EINECS 211-118 -9 \$ HENICOSANE (COMPUTER-GENERATE D NAME) \$ N-HENEICOSANE Heptadecane, 3-methyl- \$ 3-Methylh eptadecane	74197 000629-94-7 95 68992 000629-94-7 94 73718 006418-44-6 93
24	33.663	0.90	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2 E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE Cyclononasiloxane, octadecamethyl- \$ octadecamethyl-cyclononasiloxane \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14, 14,16,16,18,18-Octadecamethylcyclo nonasiloxane #	507399 066564-08-7 90 116543 000556-71-8 64
25	34.241	0.25	C:\Database\W8N05ST.L Hexadecane, 7,9-dimethyl- \$ 7,9-Di methylhexadecane CURAN, 1-ACETYL-16,17,19,20-TETRAD EHYDRO- \$ (19Z)-1-ACETYLCURA-16,19 -DIEN # \$ (19Z)-1-ACETYLCURA-16,19 -DIEN	73703 021164-95-4 35 28461 056053-16-8 35
26	35.511	1.16	C:\Database\W8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUT YL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYD ROXYPHENYL) PROPIONATE Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1 -dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester \$ Methyl 3-(3,5-di-tert-but yl-4-hydroxyphenyl)propionate \$ Me thyl 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy phenyl)propanoate # 1,2,3,4-TETRAHYDRO-1,1,4,4,6-PENTA METHYL-5,7-DINITRONAPHTHALENE	469837 000000-00-0 99 470255 006386-38-5 95 469828 000000-00-0 83
27	36.364	1.72	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 C 16:0 C 14:0	30 000929-77-1 96 12 000112-39-0 25 8 000124-10-7 25
28	37.045	0.75	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE 43.92 NONADECANE	111 000646-31-1 93 108 000638-67-5 90 104 000629-92-5 72

Ek Şekil 79. devamı

28	37.045	0.75	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE 43.92 NONADECANE	111 108 104	000646-31-1 000638-67-5 000629-92-5	93 90 72
29	37.949	0.93	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE Cyclononasiloxane, octadecamethyl- \$ octadecamethyl-cyclononasiloxane \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,14,16,16,18,18-Octadecamethylcyclo nonasiloxane # CYCLODODECASILOXANE, TETRACOSAMETH	507399 116543 113164	066564-08-7 000556-71-8 018919-94-3	64 58 30
30	38.138	0.33	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 53.54 DOCOSANE	111 107 109	000646-31-1 000629-99-2 000629-97-0	93 91 80
31	38.492	0.23	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 36.74 HEPTADECANE 56.48 TRICOSANE	107 102 108	000629-99-2 000629-78-7 000638-67-5	94 87 80
32	38.933	2.35	C:\Database\w8N05ST.L 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 \$ oleamide \$ Oleic acid amide \$ Oleyl amide \$ Slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ A mide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit O 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliph atic amide \$ Armid O \$ cis-9,10-Oct adecenoamide \$ C 9-OCTADECENAMIDE \$ OELSAEUREAMID	83152 81670	000301-02-0 999081-67-2	98 97
33	40.072	2.27	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE	107 111 108	000629-99-2 000646-31-1 000638-67-5	93 83 49
33	40.072	2.27	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE	107 111 108	000629-99-2 000646-31-1 000638-67-5	93 83 49
34	41.451	0.46	C:\Database\w8N05ST.L Heptacosane, 1-chloro- \$ 1-Chloroh eptacosane # TRICOSANE \$ AI3-35917 \$ EINECS 211 -347-4 \$ N-TRICOSANE \$ NSC 78487 HEXACOSANE \$ EINECS 211-124-1 \$ N- HEXACOSANE \$ NSC 122457	75001 69376 69894	062016-79-9 000638-67-5 000630-01-3	90 89 89
35	42.040	0.77	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399	066564-08-7	64
36	42.492	0.34	C:\Database\w8N05ST.L LUP-20(29)-EN-3-ONE, 6-HYDROXY-, C YCLIC 1,2-ETHANEDIYL ACETAL, (6.BE TA.)- \$ 3,3-ETHYLENEDIOXY-6.BETA.- HYDROXYLUP-20(29)-ENE \$ SPIRO[9H-C YCLOPENTA[A]CHRYSENE-9,2'-[1,3]DIO XOLANE], LUP-20(29)-EN-3-ONE DERIV Acetic acid, 1,3,3-trimethyl-4-oxo -6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-yl ester 1,3,3-TRIMETHYL-4-OXO-6-OXABICYCLO [3.1.0]HEX-2-YL ACETATE	189862 35622 23890	079875-70-0 999035-62-4 999023-89-2	81 72 72
37	42.629	0.45	C:\Database\w8N05ST.L CYCLODODECASILOXANE, TETRACOSAMETH YL- \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12, 14,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24,2 4-TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOX ANE # \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12, 14,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24, 24-TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOX ANE \$ 2,2,4,4,6,6 Cyclononasiloxane, octadecamethyl- \$ octadecamethyl-cyclononasiloxane \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14, 14,16,16,18,18-Octadecamethylcyclo nonasiloxane #	113164 116543	018919-94-3 000556-71-8	46 46

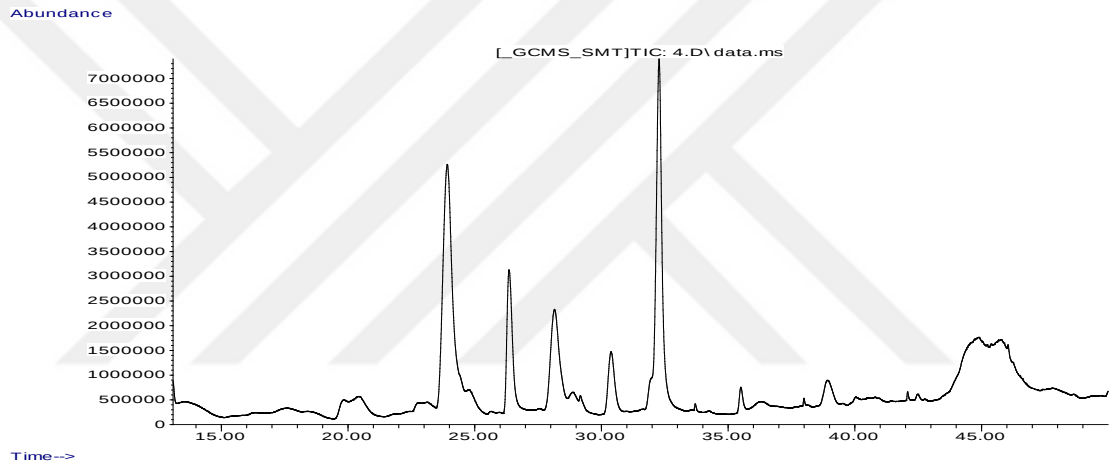
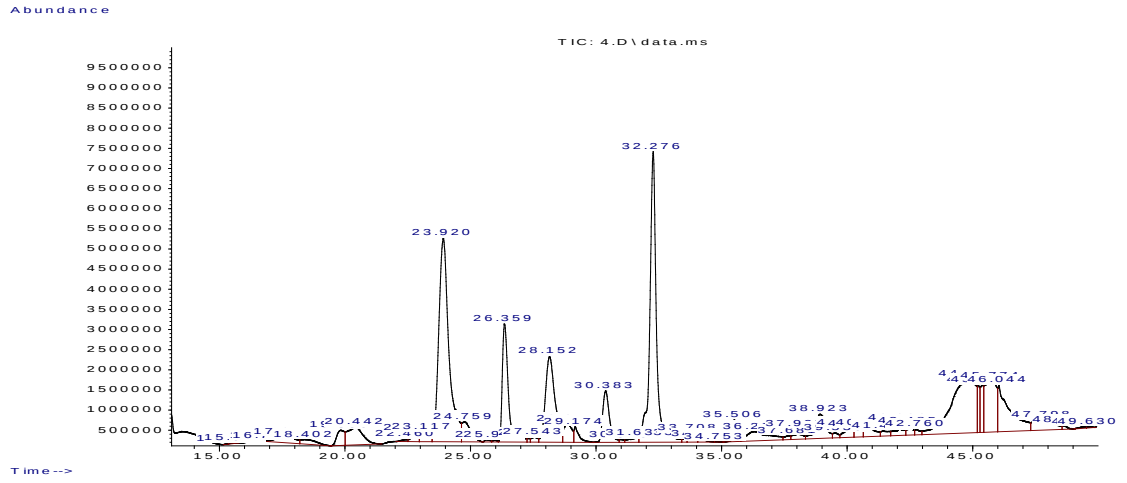
Ek Şekil 79. devamı

38	44.541	2.10	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE	107 111 108	000629-99-2 000646-31-1 000638-67-5	96 96 45
39	44.752	2.04	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 56.48 TRICOSANE	111 107 108	000646-31-1 000629-99-2 000638-67-5	96 95 50
40	46.000	0.70	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2 E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE PENTASILOXANE,	507399	066564-08-7	90
41	46.337	0.10	C:\Database\w8N05ST.L Tricosane \$ n-Tricosane TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2 11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Tetracosane \$ n-Tetracosane	74446 69558 74559	000638-67-5 000646-31-1 000646-31-1	95 95 95
42	46.589	0.43	C:\Database\w8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2 11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL	74559 69558 93053	000646-31-1 000646-31-1 000000-00-0	90 90 89
43	47.533	1.10	C:\Database\Flavor3.L 32.85 LONGIBORNEOL (=JUNIPEROL) 32.30 PERSILPHIPERFOLAN-8-OL 30.21 LIGULOXIDE	1055 671 1253	000465-24-7 080931-08-4 021764-22-7	84 30 25
40	46.000	0.70	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2 E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE PENTASILOXANE,	507399	066564-08-7	90
41	46.337	0.10	C:\Database\w8N05ST.L Tricosane \$ n-Tricosane TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2 11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Tetracosane \$ n-Tetracosane	74446 69558 74559	000638-67-5 000646-31-1 000646-31-1	95 95 95
42	46.589	0.43	C:\Database\w8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2 11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL	74559 69558 93053	000646-31-1 000646-31-1 000000-00-0	90 90 89
43	47.533	1.10	C:\Database\Flavor3.L 32.85 LONGIBORNEOL (=JUNIPEROL) 32.30 PERSILPHIPERFOLAN-8-OL 30.21 LIGULOXIDE	1055 671 1253	000465-24-7 080931-08-4 021764-22-7	84 30 25
44	47.980	0.58	C:\Database\w8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL 1-HYDROXY-2,2,5,5-TETRAMETHYL-2,5- DIHYDRO-1H-IMIDAZOLE-4-CARBALDEHYD E O-METHYLOXIME # \$ 1-HYDROXY-2,2, 5,5-TETRAMETHYL-2,5-DIHYDRO-1H-IMI DAZOLE-4-CARBALDEHYDE O-METHYLOXIM E \$ 4-METHOXYIMINOMETHYL-2,2,5,5-T ETRAMETHYL-3-IMIDAZOLINE-1-OXILE \$ 4-METHOXYIMINOME	93053 286575	000000-00-0 070345-89-0	95 64
45	48.718	0.49	C:\Database\w8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL 4-Methoxyiminomethyl-2,2,5,5-tetra methyl-3-imidazoline-1-oxyl \$ 1-Hy droxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihy dro-1H-imidazole-4-carbaldehyde o- methyloxime #	93053 287907	000000-00-0 070345-89-0	95 48

FAME 2019.M Fri Aug 09 08:27:51 2019

Ek Şekil 79: EVL numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 80. devamı



Library Search Report						
Data Path	:	D:\inan dursun\07082019fame\				
Data File	:	4.D				
Acq On	:	7 Aug 2019 18:18 (#1); 7 Aug 2019 18:05 (#2)				
Operator	:					
Sample	:	4				
Misc	:					
ALS Vial	:	4 Sample Multiplier: 1				
Search Libraries:	:	C:\Database\Famedb23.L	Minimum Quality:	80		
	:	C:\Database\Flavor3.L	Minimum Quality:	80		
	:	C:\Database\w8N05ST.L				
Unknown Spectrum:	:	Apex				
Integration Events:	:	ChemStation Integrator - autoint1.e				
PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	15.645	0.03	C:\Database\Flavor3.L			
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	97
			40.40 OCTADECANE	103	000593-45-3	95
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	87
2	17.613	1.01	C:\Database\Flavor3.L			
			40.40 OCTADECANE	103	000593-45-3	87
			53.54 DOCOSANE	109	000629-97-0	87
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	86
3	18.403	0.63	C:\Database\w8N05ST.L			
			PENTACOSANE \$ AI3-36478 \$ EINECS 2	69708	000629-99-2	81
			11-123-6 \$ N-PENTACOSANE \$ NSC 158			
			663			
4	19.833	1.02	C:\Database\Famedb23.L			
			C 14:0	8	000124-10-7	98
			C 15:0	10	007132-64-1	93
			C 16:0	12	000112-39-0	50
5	20.440	2.43	C:\Database\w8N05ST.L			
			2,3-Dimethyl-undec-1-en-3-ol	145966	999145-96-9	64
			2-PYRROLIDINONE \$ BUTANOIC ACID, 4	143826	000616-45-5	64
			AMINO- \$ PYRROLIDIN-2-ONE \$ -AMIN			
			OBUTYRIC ACID LACTAM \$ -AMINOBUTYR			
			IC LACTAM \$ -AMINOBUTYROLACTAM \$ -			
			BUTYROLACTAM \$ -PYRROLIDINONE \$ -P			
			YRROLIDONE \$ -TETRAHYDROPYRROLONE			
			\$.ALPHA.-PYRROLIDINONE \$.ALPHA.-			
			PYRROLIDONE \$.GA			

Ek Şekil 80. devamı

6	22.460	0.11	C:\Database\Flavor3.L 47.33 EICOSANE 43.92 NONADECANE 62.00 PENTACOSANE	105 104 107	000112-95-8 000629-92-5 000629-99-2	90 87 80
7	22.791	0.60	C:\Database\w8N05ST.L Benzaldehyde, 2,4-dimethyl- \$ 2,4-Dimethylbenzenecarboxaldehyde Benzaldehyde, 3,5-dimethyl- \$ 3,5-Dimethylbenzaldehyde #	275013 275001	015764-16-6 005779-95-3	83 55
8	23.118	0.78	C:\Database\w8N05ST.L 2,4-Dimethyldodecane 1-ETHOXY-1-UNDECENE \$ 1-UNDECENE, 1-ETHOXY- \$ ETHYL 1-UNDECENYL ETHER HEXANE, 2,3,5-TRIMETHYL- \$ 2,3,5-TRIMETHYLHEXANE \$ EINECS 213-957-6	35613 144629 19733	006117-99-3 999144-63-2 001069-53-0	49 45 38
9	23.919	18.37	C:\Database\Famedb23.L C 16:0 C 14:0 C 15:0	12 8 10	000112-39-0 000124-10-7 007132-64-1	98 58 53
10	24.760	1.61	C:\Database\w8N05ST.L 9-HEXADECENOIC ACID, METHYL ESTER, (Z)- \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE E # \$ AI3-36450 \$ EINECS 214-303-2 \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ METHYL (Z)-HEXADEC-9-ENOATE \$ METHYL 9-HEXADECENOATE \$ METHYL PA 9-HEXADECENOIC ACID, METHYL ESTER, (Z)- \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE E # \$ AI3-36450 \$ EINECS 214-303-2 \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ METHYL (Z)-HEXADEC-9-ENOATE \$ METHYL 9-HEXADECENOATE \$ METHYL PA 9-HEXADECENOIC ACID, METHYL ESTER, (Z)- \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE E # \$ AI3-36450 \$ EINECS 214-303-2 \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE \$ METHYL (9Z)-9-HEXADECENOATE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ METHYL (Z)-HEXADEC-9-ENOATE \$ METHYL 9-HEXADECENOATE \$ METHYL PA	56151 56152 56149	001120-25-8 001120-25-8 001120-25-8	89 86 84
11	25.647	0.10	C:\Database\w8N05ST.L DECANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLDECANE \$ 2-METHYL-DECANE \$ DECANE, 2-METHYL- (8CI) (9CI) \$ EINECS 230-236-1 \$ N-C8H17CH(CH3)2 \$ NSC 20567 Decane, 2-methyl- \$ 2-Methyldecane	21358 34153	006975-98-0 006975-98-0	30 30
12	25.979	0.07	C:\Database\Famedb23.L C 17:0 C 10:0 C 20:0	14 4 23	001731-92-6 000110-42-9 001120-28-1	86 30 16
13	26.356	6.26	C:\Database\w8N05ST.L PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$ 2,4-DITERT-BUTYLPHENOL \$ 1-HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 1-HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 2,4-DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)PHENOL \$ 2,4-BIS(TERT-BUTYL)-PHENOL \$ 2,4-BIS(TERT-BUTYL)PHENOL \$ Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2,4-di-tert-butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-tert-butylbenzene \$ Antioxidant No. 33 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$ 2,4-DITERT-BUTYLPHENOL \$ 1-HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 1-HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 2,4-DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)PHENOL \$ 2,4-BIS(TERT-BUTYL)-PHENOL \$ 2,4-BIS(TERT-BUTYL)PHENOL \$	382338 383416 382339	000096-76-4 000096-76-4 000096-76-4	95 95 94
14	27.541	0.40	C:\Database\w8N05ST.L PHENOL, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$ DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ PHENOL, DI-TERT-BUTYL- HEPTADECANE \$ AI3-36898 \$ BRN 1738898 \$ EINECS 211-108-4 \$ HEPTADECANE \$ N-HEPTADECANE \$ NORMAL-HEPTADECANE \$ NSC 172782	382347 25970	026746-38-3 000629-78-7	90 70
15	28.153	7.32	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 C 14:0 C 16:0	16 8 12	000112-61-8 000124-10-7 000112-39-0	98 93 59

Ek Şekil 80. devamı

16	28.874	1.31	C:\Database\Famedb23.L C 18:1 (cis - 9) (omega 9) C 18:1 (trans - 9) (omega 9) C 16:1 (cis - 9)	18 000112-62-9 99 17 001937-62-8 99 13 001120-25-8 49
17	29.171	0.69	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE 6-AZA-5,7,12,14-TETRATHIAPENTACENE	507399 066564-08-7 53 507397 000000-00-0 38
18	30.384	3.11	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	19 002566-97-4 99 20 000112-63-0 99 25 002463-02-7 90
19	30.974	0.11	C:\Database\W8N05ST.L Sulfurous acid, butyl octadecyl ester 1-DOCOSENE \$ AI3-36497 \$ EINECS 21 6-490-6 \$ NSC 78486	74879 999074-88-1 49 74303 001599-67-3 42 69165 001599-67-3 42
20	31.632	0.36	C:\Database\W8N05ST.L IRON IODIDE COMPLEX I (4BS,9RS,10'AS)-4,4A,10,10'A-TETRAHYDRO-1',6-DIHYDROXY-1,2,4A,7',8',10'A-HEXAMETHYL-3',7-BIS(2-PROPENYL-SPIRO[3H,9H-PHENANTHRENE-9,5'(5'H)-PHENANTHRO[1,10-BC]FURAN]2',3,5,8,9'-PENTONE \$ DIMER OF COLEON F	70999 999071-00-1 10 44393 122346-71-8 10
21	32.278	16.81	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) C 18:3 (gamma) (all cis - 6,9,12) (omega 6)	22 000301-00-8 99 29 055682-88-7 87 21 002676-41-7 43
22	33.543	0.14	C:\Database\W8N05ST.L OCTADECANE \$ AI3-06523 \$ CCRIS 681 \$ EINECS 209-790-3 \$ N-OCTADECANE \$ NSC 4201 \$ OCTADECANE DOCOSANE, 11-DECYL- \$ 11-DECYLDOSANE \$ 11-DECYLDOSANE # \$ 11-DEC	68157 000593-45-3 46 70506 055401-55-3 46
23	33.709	0.26	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE Cyclononasiloxane, octadecamethyl- \$ octadecamethyl-cyclononasiloxane \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,14,16,16,18,18-Octadecamethylcyclononasiloxane #	507399 066564-08-7 91 116543 000556-71-8 87
24	34.241	0.16	C:\Database\W8N05ST.L 2-HEXEN-1-OL, 2-ETHYL- \$ (2E)-2-ETHYL-2-HEXEN-1-OL # \$ (2E)-2-ETHYL-2-HEXEN-1-OL \$ 2-ETHYL-2-HEXEN-1-OL \$ 2-ETHYLHEX-2-ENOL \$ EINECS 256-675-9	64698 050639-00-4 35
25	35.506	0.81	C:\Database\W8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYDROXYPHENYL) PROPIONATE Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester \$ Methyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate \$ Methyl 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxyphenyl)propanoate #	469837 000000-00-0 99 470255 006386-38-5 95
26	36.301	1.86	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 C 13:0 C 10:0	30 000929-77-1 97 7 001731-88-0 60 4 000110-42-9 38
27	37.680	0.21	C:\Database\W8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 TRICOSANE \$ AI3-35917 \$ EINECS 211-347-4 \$ N-TRICOSANE \$ NSC 78487	74559 000646-31-1 89 69558 000646-31-1 89 69376 000638-67-5 76

Ek Şekil 80. devamı

28	37.995	0.53	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2 E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399	066564-08-7	91
29	38.922	2.28	C:\Database\W8N05ST.L 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 \$ Oleamide \$ Oleic acid amide \$ o leyl amide \$ Slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ A mide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit o 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliph atic amide \$ Armid O \$ cis-9,10-oc tadecenoamide \$ C 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 \$ Oleamide \$ Oleic acid amide \$ o leyl amide \$ Slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ A mide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit o 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliph atic amide \$ Armid O \$ cis-9,10-oc tadecenoamide \$ C	83152	000301-02-0	94
				83151	000301-02-0	93
30	39.528	0.24	C:\Database\W8N05ST.L 2,5-FURANDIONE, 3-(DODECENYL)DIHYD RO- \$ 2,5-FURANDIONE, 3-DODECYL- \$ 2-(DODECYL)SUCCINIC ANHYDRIDE \$ C CRIS 698 \$ DDS \$ DDS A \$ DDSA \$ DO DECENYL SUCCINNIC ANHYDRIDE \$ DODE CENYLSUCCINIC ACID ANHYDRIDE \$ DOD ECENYLSUCCINIC ANHYDRIDE \$ DODECEN YLSUCCINNIC ANHYD 2-Dodecen-1-yl(-)succinic anhydrid e \$ 2,5-Furandione, 3-dodecenyl- \$ n-Dodecenylsuccinic anhydride \$ D odecenyl succinic anhydride \$ 2,5- Furandione, 3-(2-dodecenyl)dihydro - \$ 2-Dodecen-1-ylsuccinic anhydi de \$ 3-[(2E)-2-Dodecenyl]dihydro-2 ,5-furandione # DOCOSANE \$ C22H46 STANDARD \$ EINEC S 211-121-5 \$ N-DOCOSANE \$ NORMAL- DOCOSANE \$ NSC 77139	11100	025377-73-5	90
				14259	019780-11-1	90
				69207	000629-97-0	86
31	40.049	0.73	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 53.54 DOCOSANE	111 107 109	000646-31-1 000629-99-2 000629-97-0	93 93 76
32	40.495	0.56	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE 53.54 DOCOSANE	111 108 109	000646-31-1 000638-67-5 000629-97-0	98 97 97
33	40.798	0.88	C:\Database\Flavor3.L 50.47 HENEICOSANE 47.33 EICOSANE 62.00 PENTACOSANE	110 105 107	000629-94-7 000112-95-8 000629-99-2	95 94 83
34	41.434	0.25	C:\Database\Flavor3.L 53.54 DOCOSANE 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE	109 107 111	000629-97-0 000629-99-2 000646-31-1	86 86 86
35	42.092	0.76	C:\Database\W8N05ST.L CYCLODODECASILOXANE, TETRACOSAMETH YL- \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12, 14,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24,2 4-TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOXA NE # \$ 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12, 14,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24, 24-TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOX ANE \$ 2,2,4,4,6,6	113164	018919-94-3	64
36	42.486	0.46	C:\Database\W8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane Hexanoic acid, 2-hexenyl ester, (E)- \$ trans-2-Hexenyl caproate \$ tr ans-2-Hexenyl Hexanoate \$ trans-2- Hexenyl n-hexanoate \$ (2E)-2-Hexen yl hexanoate #	74546 190342	000646-31-1 053398-86-0	92 68
37	42.761	0.22	C:\Database\Flavor3.L 50.47 HENEICOSANE 62.00 PENTACOSANE 47.33 EICOSANE	110 107 105	000629-94-7 000629-99-2 000112-95-8	92 89 78
38	44.890	11.86	C:\Database\Flavor3.L 40.40 OCTADECANE 46.92 EICOSENE<1-> 50.47 HENEICOSANE	103 1259 110	000593-45-3 003452-07-1 000629-94-7	96 90 81

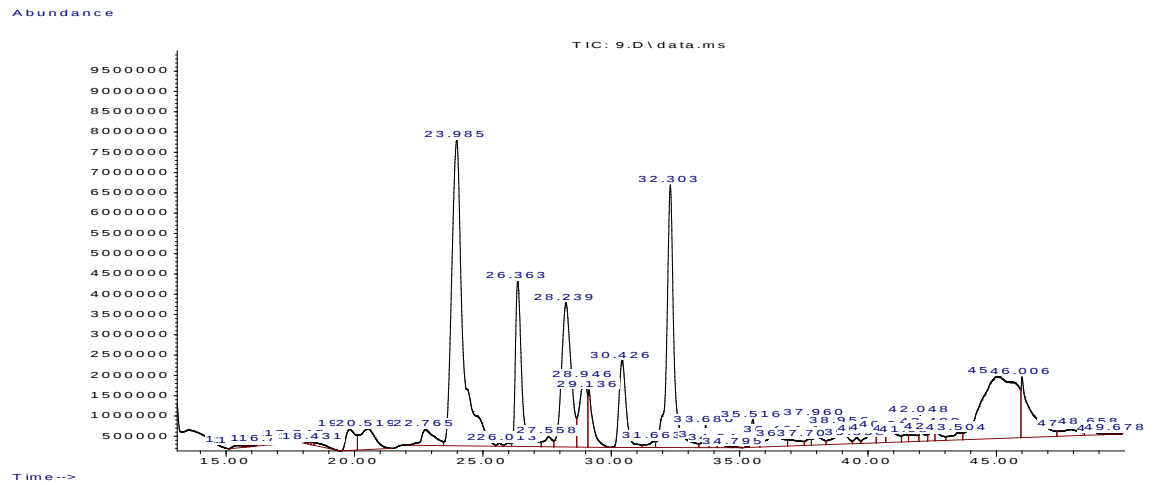
Ek Şekil 80. devamı

39	45.222	0.94	C:\Database\Flavor3.L						
			43.92 NONADECANE		104	000629-92-5	96		
			40.40 OCTADECANE		103	000593-45-3	96		
			46.92 EICOSENE<1->		1259	003452-07-1	90		
40	45.387	1.35	C:\Database\Flavor3.L						
			40.40 OCTADECANE		103	000593-45-3	95		
			46.92 EICOSENE<1->		1259	003452-07-1	90		
			53.54 DOCOSANE		109	000629-97-0	87		
41	45.777	5.25	C:\Database\W8N05ST.L						
			1-Nonadecene		185401	018435-45-5	95		
			Tetrapentacontane, 1,54-dibromo-		75414	999075-41-6	93		
			Tetracosane \$ n-Tetracosane		74558	000646-31-1	91		
42	46.045	5.02	C:\Database\Flavor3.L						
			50.47 HENEICOSANE		110	000629-94-7	90		
			47.33 EICOSANE		105	000112-95-8	89		
			59.33 TETRACOSANE		111	000646-31-1	83		
43	47.796	1.81	C:\Database\W8N05ST.L						
			Octacosanoic acid, methyl ester \$	118236	055682-92-3	68			
			Methyl octacosanoate						
			Octacosanoic acid, methyl ester \$	118238	055682-92-3	46			
			Methyl octacosanoate						
44	48.632	0.16	C:\Database\W8N05ST.L						
			TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2	69555	000646-31-1	72			
			11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298						
			Tetradecane, 1-bromo- \$ n-Tetradec	37853	000112-71-0	52			
			yl-1-bromide \$ Myristyl bromide \$						
			Tetradecyl bromide \$ 1-Bromotetrad						
			ecane \$ 1-Tetradecyl bromide \$ n-T						
45	49.399	0.08	C:\Database\W8N05ST.L						
			CYCLOTRIACONTANE \$ CYCLOTRIACONTAN	70333	000297-35-8	86			
			CYCLOOCTACOSANE	70123	000297-24-5	59			
			TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2	69555	000646-31-1	55			
			11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298						
46	49.633	0.05	C:\Database\Flavor3.L						
			53.54 DOCOSANE	109	000629-97-0	92			
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	90			
			62.00 PENTACOSANE	107	000629-99-2	90			

FAME 2019.M Fri Aug 09 08:17:00 2019

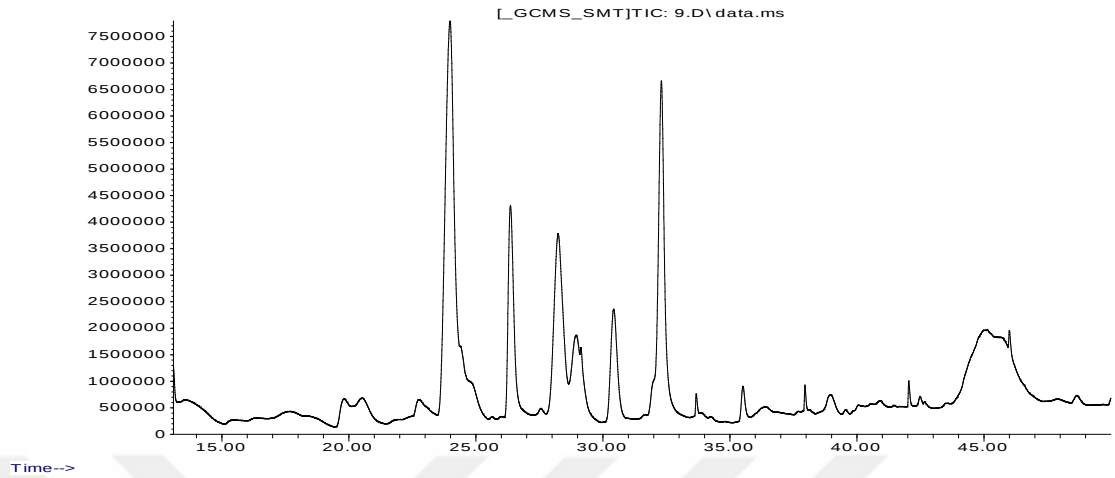
Ek Şekil 80: LTH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 81. devamı



Ek Şekil 81. devamı

Abundance



Library Search Report

Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\
 Data File : 9.D
 Acq On : 7 Aug 2019 22:49 (#1); 7 Aug 2019 22:36 (#2)
 Operator :
 Sample : 9
 Misc :
 ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\W8N05ST.L

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	15.444	0.18	C:\Database\W8N05ST.L 1,3-Dioxolane, 2-heptyl-4-octadecyl- loxyethyl- 2,4(1H,3H)-QUINOLINEDIONE, 3-BENZO YL-3-(PHENYLMETHYL)- \$ 3-BENZOYL-3 -BENZYL-2,4(1H,3H)-QUINOLINEDIONE # \$ 3-BENZOYL-3-BENZYL-2(1H),4(3H) -QUINOLINEDIONE \$ 3-BENZOYL-3-BENZY L-2,4(1H,3H)-QUINOLINEDIONE \$ NSC 370855	507645	999507-66-6	50
2	15.810	0.02	C:\Database\Flavor3.L 47.33 EICOSANE 43.92 NONADECANE 40.40 OCTADECANE	105 104 103	000112-95-8 000629-92-5 000593-45-3	97 94 89
3	15.936	0.01	C:\Database\Flavor3.L 47.33 EICOSANE 40.40 OCTADECANE 50.47 HENEICOSANE	105 103 110	000112-95-8 000593-45-3 000629-94-7	93 93 74
4	16.417	0.13	C:\Database\W8N05ST.L TETRATRIACONTANE \$ AI3-36492 \$ EIN ECS 238-013-0 \$ N-TETRATRIACONTANE \$ NSC 2998 2-METHYLHEPTADECANE \$ HEPTADECAN,	70648 68172	014167-59-0 001560-89-0	87 86
5	17.670	0.19	C:\Database\Flavor3.L 56.48 TRICOSANE 53.54 DOCOSANE 50.47 HENEICOSANE	108 109 110	000638-67-5 000629-97-0 000629-94-7	90 86 86

Ek Şekil 81. devamı

6	19.816	1.33	C:\Database\Famedb23.L C 14:0 C 20:0 C 16:0	8 23 12	000124-10-7 001120-28-1 000112-39-0	97 64 59
7	20.520	2.16	C:\Database\w8N05ST.L 2-PYRROLIDINONE \$ BUTANOIC ACID, 4 -AMINO- \$ PYRROLIDIN-2-ONE \$ -AMIN OBUTYRIC ACID LACTAM \$ -AMINOBUTYR IC LACTAM \$ -AMINOBUTYROLACTAM \$ - BUTYROLACTAM \$ -PYRROLIDINONE \$ -P YRROLIDONE \$ -TETRAHYDROPYRROLONE \$.ALPHA.-PYRROLIDINONE \$.ALPHA.- PYRROLIDONE \$.GA 2(3H)-FURANONE, 5-BUTYLDIHYDRO- \$ OCTANOIC ACID, 4-HYDROXY-, LACTONE \$ 5-BUTYLDIHYDRO-2(3H)-FURANONE # \$.GAMMA.-BUTYL-, GAMMA.-BUTYROLAC TONE \$.GAMMA.-BUTYLBUTYROLACTONE \$.GAMMA.-N-BUTYL-, GAMMA.-BUTYROLA CTONE \$.GAMMA.-OCTALACTONE \$.	143826 144109	000616-45-5 000104-50-7	64 64
8	22.763	1.42	C:\Database\w8N05ST.L BENZALDEHYDE, 3,4-DIMETHYL- \$ 3,4- DIMETHYLBENZALDEHYDE \$ EINECS 227- 770-2 Benzaldehyde, 3,4-dimethyl- \$ 3,4- dimethylbenzaldehyde	273654 275014	005973-71-7 005973-71-7	78 78
9	23.981	23.53	C:\Database\Famedb23.L C 16:0 C 14:0 C 15:0	12 8 10	000112-39-0 000124-10-7 007132-64-1	98 72 59
10	25.641	0.10	C:\Database\w8N05ST.L octanal dimethyl acetal \$ octane, 1,1-dimethoxy- \$ n-Octanal dimethy l acetal \$ 1,1-Dimethoxyoctane # Acetate, 2-[(acetyloxy)methyl]-4,4 -dimethoxybutyl ester \$ 2-[(Acetyl oxy)methyl]-4,4-dimethoxybutyl ace tate #	120363 120704	010022-28-3 119117-34-9	43 27
11	26.013	0.13	C:\Database\Famedb23.L C 17:0 C 10:0 C 20:0	14 4 23	001731-92-6 000110-42-9 001120-28-1	95 43 37
12	26.362	7.05	C:\Database\w8N05ST.L Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	383370 383416	000096-76-4 000096-76-4	96 95
13	27.558	0.59	C:\Database\w8N05ST.L PHENOL, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$ DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ PHENOL, DI-T ERT-BUTYL PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL) - \$ 2,4-DITERT-BUTYLPHENOL \$ 1-HYD ROXY-2, 4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 1 -HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 2,4 DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ 2,4-BI S(1,1-DIMETHYLETHYL)PHENOL \$ 2,4-BI IS(TERT-BUTYL)-PHENOL \$ 2,4-BIS(TE RT-BUTYL)PHENOL \$	382347 382341	026746-38-3 000096-76-4	90 53
14	28.239	9.48	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 C 16:0 C 14:0	16 12 8	000112-61-8 000112-39-0 000124-10-7	98 64 64
15	28.948	3.50	C:\Database\Famedb23.L C 18:1 (trans - 9) (omega 9) C 18:1(cis - 9) (omega 9) C 16:1 (cis - 9)	17 18 13	001937-62-8 000112-62-9 001120-25-8	99 99 50
16	29.137	1.92	C:\Database\Famedb23.L C 18:1(cis - 9) (omega 9) C 18:1 (trans - 9) (omega 9)	18 17	000112-62-9 001937-62-8	91 91
17	30.424	4.28	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	19 20 25	002566-97-4 000112-63-0 002463-02-7	99 99 91

Ek Şekil 81. devamı

18	31.660	0.32	C:\Database\w8N05ST.L Tetratetracontane \$ n-Tetratetracontane Tetratriacontane \$ n-Tetratriacontane	75340 007098-22-8 68 75175 014167-59-0 68
19	32.301	12.79	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	22 000301-00-8 99 29 055682-88-7 87 27 001783-84-3 38
20	33.680	0.51	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399 066564-08-7 90
21	33.875	0.29	C:\Database\w8N05ST.L Tricosane, 2-methyl- \$ 2-Methyltricosane Docosane, 2,21-dimethyl- \$ 2,21-Dimethyldocosane # 2,21-DIMETHYLDOCOSANE \$ 2,21-DIMETHYLDOCOSANE # \$ DOCOSANE, 2,21-DIMETHYL-	39430 001928-30-9 70 39411 077536-31-3 70 28973 077536-31-3 70
22	34.241	0.21	C:\Database\w8N05ST.L 1,14-Dibromotetradecane \$ Tetradecane, 1,14-dibromo- 1-METHYL-4-PHENYL-4-PIPERIDINECARBOXYLIC ACID # \$ 1-METHYL-4-PHENYL-4-PIPERIDINECARBOXYLIC ACID \$ 4-PIPERIDINECARBOXYLIC ACID, 1-METHYL-4-PHENYL- \$ 4-PIPERIDINECARBOXYLIC ACID, 1-METHYL-4-PHENYL- (9CI) \$ ISONIPECOTIC ACID, 1-METHYL-4-PHENYL- \$ ISONIPECOTI (4BS,9RS,10'AS)-4,4A,10,10'A-TETRAHYDRO-1,6-DIHYDROXY-1,2,4A,7',8',10'A-HEXAMETHYL-3',7-BIS(2-PROPENYL-SPIRO[3H,9H-PHENANTHRENE-9,5'(5'H)-PHENANTHRO[1,10-BC]FURAN]2',3,5,8,9'-PENTONE \$ DIMER OF COLEON F	74664 037688-96-3 37 102315 003627-48-3 27 44393 122346-71-8 25
22	34.241	0.21	C:\Database\w8N05ST.L 1,14-Dibromotetradecane \$ Tetradecane, 1,14-dibromo- 1-METHYL-4-PHENYL-4-PIPERIDINECARBOXYLIC ACID #	74664 037688-96-3 37 102315 003627-48-3 27
23	35.517	0.80	C:\Database\w8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYDROXYPHENYL) PROPIONATE Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester \$ Methyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate \$ Methyl 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxyphenyl)propanoate #	469837 000000-00-0 99 470255 006386-38-5 94
24	36.404	1.79	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 C 13:0 C 15:0	30 000929-77-1 95 7 001731-88-0 35 10 007132-64-1 25
25	37.708	0.24	C:\Database\w8N05ST.L TRICOSANE \$ AI3-35917 \$ EINECS 211-347-4 \$ N-TRICOSANE \$ NSC 78487 TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Tetracosane \$ n-Tetracosane	69375 000638-67-5 90 69553 000646-31-1 90 74557 000646-31-1 90
26	37.960	0.73	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399 066564-08-7 92
27	38.956	1.39	C:\Database\w8N05ST.L 9-OCTADECENAMIDE \$ OELSAEUREAMID 9-OCTADECENAMIDE \$ 9-OCTADECENAMIDE, (Z)- \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE # \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ (Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ 9-OCTADECENAMIDE, (9Z)- \$ 9-OCTADECENAMIDE, (Z)- (9CI) \$ 9-OCTADECENOIC ACID,	81670 999081-67-2 98 81667 000301-02-0 98

Ek Şekil 81. devamı

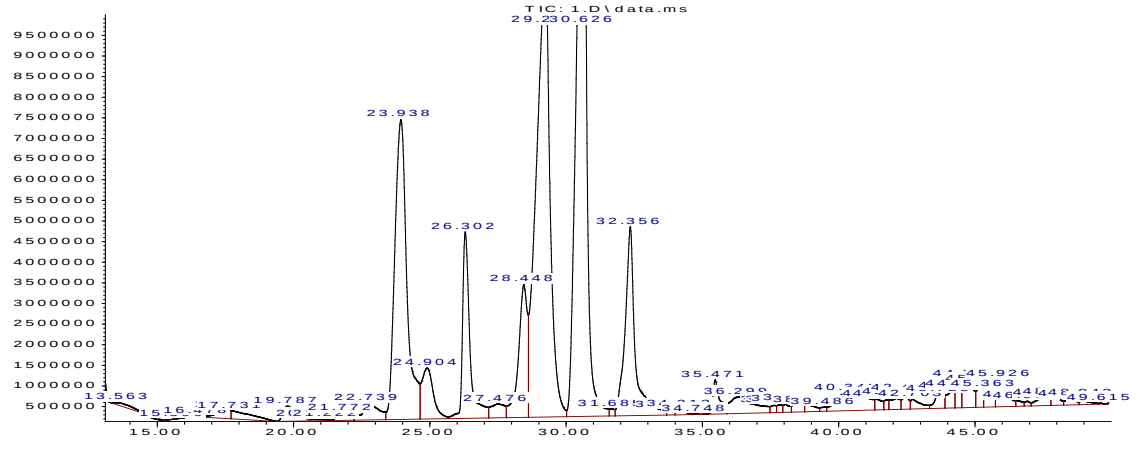
28	39.557	0.20	C:\Database\w8N05ST.L Pyridine, 4-[5-(2-methoxyphenyl)-[1,3,4]oxadiazol-2-yl]- EICOSANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLICOSANE \$ 2-METHYLICOSANE # \$ 19-METHYLEICOSANE \$ 2-METHYLEICOSANE \$ 2-METHYLICOSANE (COMPUTER-GENERATED NAME)	451563 999451-57-4 91 68984 001560-84-5 59
29	40.066	0.60	C:\Database\w8N05ST.L DECANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLDECANE \$ 2-METHYL-DECANE \$ DECANE, 2-METHYL- (8CI)(9CI) \$ EINECS 230-236-1 \$ N-C8H17CH(CH3)2 \$ NSC 20567 DECANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLDECANE \$ 2-METHYL-DECANE \$ DECANE, 2-METHYL- (8CI)(9CI) \$ EINECS 230-236-1 \$ N-C8H17CH(CH3)2 \$ NSC 20567	21359 006975-98-0 89 65519 006975-98-0 78
30	40.552	0.47	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 28.82 PENTADECANE	107 000629-99-2 98 111 000646-31-1 96 100 000629-62-9 89
31	40.913	0.83	C:\Database\Flavor3.L 43.92 NONADECANE 59.33 TETRACOSANE 47.33 EICOSANE	104 000629-92-5 97 111 000646-31-1 96 105 000112-95-8 95
32	41.456	0.29	C:\Database\w8N05ST.L DOCOSANE \$ C22H46 STANDARD \$ EINECS 211-121-5 \$ N-DOCOSANE \$ NORMAL-DOCOSANE \$ NSC 77139 Nonacosane \$ n-Nonacosane Octadecane, 3-methyl- \$ 3-methyl octadecane	69205 000629-97-0 89 74975 000630-03-5 87 73909 006561-44-0 87
33	41.674	0.35	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 47.33 EICOSANE	107 000629-99-2 91 111 000646-31-1 83 105 000112-95-8 80
34	42.046	0.54	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399 066564-08-7 95
35	42.492	0.80	C:\Database\w8N05ST.L Acetic acid, 1,3,3-trimethyl-4-oxo-6-oxabicyclo[3.1.0]hex-2-yl ester [3.1.0]HEX-2-YL ACETATE	35622 999035-62-4 72 23890 999023-89-2 72
36	43.505	0.53	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 15.77 DODECANE	107 000629-99-2 86 111 000646-31-1 86 97 000112-40-3 70
37	45.136	14.76	C:\Database\Flavor3.L 40.40 OCTADECANE 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE	103 000593-45-3 96 107 000629-99-2 87 111 000646-31-1 87
38	46.005	4.43	C:\Database\w8N05ST.L OCTADECANE, 3-ETHYL-5-(2-ETHYLBUTYL)- \$ 3-ETHYL-5-(2-ETHYLBUTYL)OCTADECANE \$ 3-ETHYL-5-(2-ETHYLBUTYL)OCTADECANE # \$ 3-ETHYL-5-(2-ETHYLBUTYL)OCTADECANE \$ 3-ETHYL-5-(2-ETHYLBUTYL)OCTADECANE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ NSC 157984 \$ OCTADECANE	29645 055282-12-7 49
39	47.854	0.66	C:\Database\w8N05ST.L 4-METHOXY-2-BUTYN-1-OL # \$ 2-BUTYN-1-OL, 4-METHOXY- \$ 4-METHOXY-2-BUTYN-1-OL 4-METHOXY-2-BUTYN-1-OL # \$ 2-BUTYN-1-OL, 4-METHOXY- \$ 4-METHOXY-2-BUTYN-1-OL	6328 018857-03-9 27 6324 018857-03-9 27
40	48.655	0.45	C:\Database\w8N05ST.L GLYCINE, N-[N-(2-HYDROXYBENZOYL)-BETA.-ALANYL]-, METHYL ESTER \$ METHYL [N-(SALICYL)-3-AMIDEPROPANOYL]-AMINOACETATE	27355 118744-44-8 55
41	49.679	0.01	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE	107 000629-99-2 92 111 000646-31-1 78 108 000638-67-5 49

FAME 2019.M Fri Aug 09 08:21:28 2019

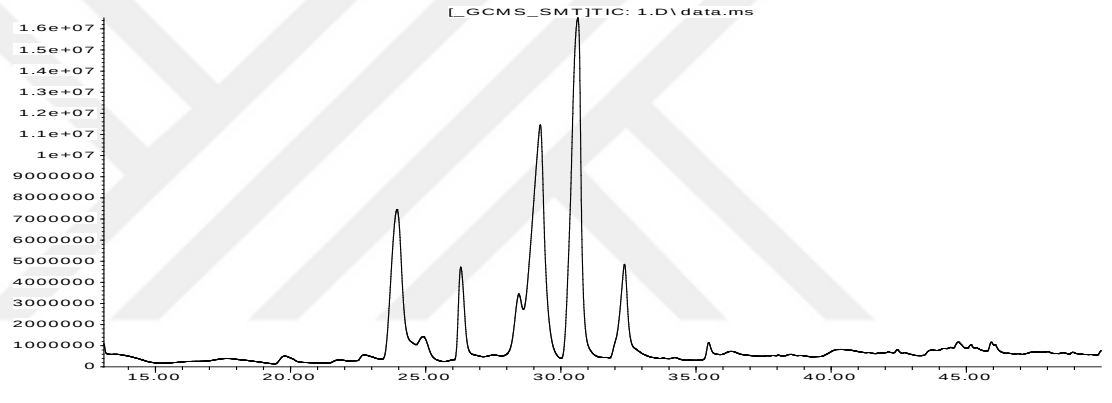
Ek Şekil 81: LTL numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 82. devamı

Abundance



Abundance



Library Search Report

Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\
 Data File : 1.D
 Acq On : 7 Aug 2019 15:35 (#1); 7 Aug 2019 15:22 (#2)
 Operator :
 Sample : 1
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\W8N05ST.L

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	16.480	0.12	C:\Database\Flavor3.L			
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	91
			53.54 DOCOSANE	109	000629-97-0	90
			40.40 OCTADECANE	103	000593-45-3	86
2	17.624	1.24	C:\Database\Flavor3.L			
			56.48 TRICOSANE	108	000638-67-5	90
			40.40 OCTADECANE	103	000593-45-3	87
			62.00 PENTACOSANE	107	000629-99-2	86
3	19.787	0.85	C:\Database\Famedb23.L			
			C 14:0	8	000124-10-7	97
			C 10:0	4	000110-42-9	53
			C 16:0	12	000112-39-0	50
4	21.161	0.01	C:\Database\Flavor3.L			
			56.48 TRICOSANE	108	000638-67-5	86
			40.40 OCTADECANE	103	000593-45-3	86
			59.33 TETRACOSANE	111	000646-31-1	78
5	21.224	0.01	C:\Database\Flavor3.L			
			59.33 TETRACOSANE	111	000646-31-1	90
			43.92 NONADECANE	104	000629-92-5	86
			28.82 PENTADECANE	100	000629-62-9	64
6	21.773	0.35	C:\Database\Famedb23.L			
			C 15:0	10	007132-64-1	96
			C 16:0	12	000112-39-0	43
			C 14:0	8	000124-10-7	38

Ek Şekil 82. devamı

7	22.740	1.04	C:\Database\W8N05ST.L Benzaldehyde, 3,5-dimethyl- \$ 3,5- Dimethylbenzaldehyde # Benzaldehyde, 3,4-dimethyl- \$ 3,4- Dimethylbenzaldehyde BENZALDEHYDE, ETHYL- \$ AR-ETHYLBEN ZALDEHYDE \$ ETHYLBENZALDEHYDE \$ P- ETHYLBENZALDEHYDE	275001 005779-95-3 50 275014 005973-71-7 45 273650 053951-50-1 45
8	23.936	13.86	C:\Database\Famedb23.L C 16:0 C 15:0 C 14:0	12 000112-39-0 98 10 007132-64-1 81 8 000124-10-7 72
9	24.903	2.24	C:\Database\Famedb23.L C 16:1 (cis - 9) C 10:0 C 8:0	13 001120-25-8 99 4 000110-42-9 10 3 000111-11-5 10
10	26.305	5.21	C:\Database\W8N05ST.L Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t- Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t- Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL) - \$ 2,4-DITERT-BUTYLPHENOL \$ 1-HYD ROXY-2, 4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 1 -HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 2,4 DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ 2,4-BI S(1,1-DIMETHYLETHYL)PHENOL \$ 2,4-B IS(TERT-BUTYL)-PHENOL \$ 2,4-BIS(TE RT-BUTYL)PHENOL \$	383370 000096-76-4 96 383416 000096-76-4 95 382339 000096-76-4 94
11	27.478	0.73	C:\Database\W8N05ST.L PHENOL, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$ DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ PHENOL, DI-T ERT-BUTYL- EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTE R-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ N SC 62789 EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTE R-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ N SC 62789	382347 026746-38-3 90 68699 000112-95-8 64 68701 000112-95-8 58
12	28.450	4.48	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 C 14:0 C 16:0	16 000112-61-8 98 8 000124-10-7 93 12 000112-39-0 64
13	29.240	23.66	C:\Database\Famedb23.L C 18:1(cis - 9) (omega 9) C 18:1 (trans - 9) (omega 9) C 16:1 (cis - 9)	18 000112-62-9 99 17 001937-62-8 99 13 001120-25-8 45
14	30.625	26.28	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	20 000112-63-0 99 19 002566-97-4 99 25 002463-02-7 90
15	32.358	7.24	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	22 000301-00-8 99 29 055682-88-7 90 27 001783-84-3 37
16	33.789	0.12	C:\Database\Flavor3.L 47.33 EICOSANE 50.47 HENEICOSANE 53.54 DOCOSANE	105 000112-95-8 92 110 000629-94-7 53 109 000629-97-0 53
17	34.212	0.19	C:\Database\W8N05ST.L HEXACOSANE \$ EINECS 211-124-1 \$ N- HEXACOSANE \$ NSC 122457 Tetracosane \$ n-Tetracosane Hexacosane \$ n-Hexacosane	69894 000630-01-3 40 74546 000646-31-1 25 74760 000630-01-3 25

Ek Şekil 82. devamı

18	35.471	0.90	C:\Database\w8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYDROXYPHENYL) PROPIONATE Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester \$ Methyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate \$ Methyl 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxyphenyl)propanoate # 6-ETHYL-5-HYDROXY-2,3,7-TRIMETHOXY NAPHTHOQUINONE	469837	000000-00-0	99
19	36.301	1.51	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 C 16:0 C 15:0	30 12 10	000929-77-1 000112-39-0 007132-64-1	97 38 32
20	37.646	0.14	C:\Database\Flavor3.L 56.48 TRICOSANE 62.00 PENTACOSANE 47.33 EICOSANE	108 107 105	000638-67-5 000629-99-2 000112-95-8	81 74 72
21	37.834	0.15	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE 47.33 EICOSANE	111 108 105	000646-31-1 000638-67-5 000112-95-8	93 90 53
22	38.035	0.19	C:\Database\w8N05ST.L EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ NSC 62789 EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ NSC 62789 Octadecane, 3-methyl- \$ 3-Methyl octadecane	68700 68698 73909	000112-95-8 000112-95-8 006561-44-0	94 93 93
23	38.475	0.33	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 53.54 DOCOSANE	107 111 109	000629-99-2 000646-31-1 000629-97-0	92 91 52
24	38.842	0.26	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 32.89 HEXADECANE 47.33 EICOSANE	111 101 105	000646-31-1 000544-76-3 000112-95-8	90 53 49
25	40.346	2.10	C:\Database\Flavor3.L 53.54 DOCOSANE 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE	109 107 111	000629-97-0 000629-99-2 000646-31-1	96 76 76
26	41.382	0.28	C:\Database\w8N05ST.L DOCOSANE \$ C22H46 STANDARD \$ EINECS 211-121-5 \$ N-DOCOSANE \$ NORMAL-DOCOSANE \$ NSC 77139 Docosane \$ n-Docosane \$ Normal-docosane Tetracosane \$ n-Tetracosane	69206 74334 74558	000629-97-0 000629-97-0 000646-31-1	97 97 95
27	41.771	0.20	C:\Database\Flavor3.L 56.48 TRICOSANE 32.89 HEXADECANE 50.47 HENEICOSANE	108 101 110	000638-67-5 000544-76-3 000629-94-7	90 70 58
28	42.114	0.34	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 53.54 DOCOSANE 47.33 EICOSANE	107 109 105	000629-99-2 000629-97-0 000112-95-8	86 58 58
29	42.446	0.35	C:\Database\w8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane Hexanoic acid, 3-chloroprop-2-enyl ester Tetradecane, 2,6,10-trimethyl- \$ 2,6,10-Trimethyltetradecane	74546 190278 73542	000646-31-1 999190-28-1 014905-56-7	68 53 46
30	42.704	0.35	C:\Database\w8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane 1-Chloroeicosane \$ Eicosane, 1-chloro- \$ 1-Chloroeicosane # HEXACOSANE \$ EINECS 211-124-1 \$ N-HEXACOSANE \$ NSC 122457	74546 74379 69894	000646-31-1 042217-02-7 000630-01-3	91 72 64
31	43.722	0.48	C:\Database\w8N05ST.L TRIDECANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLTRIDECANE \$ 2-METHYL-N-TRIDECANE \$ 2-METHYL-TRIDECANE Tridecane, 2-methyl- \$ 2-Methyltridecane \$ 2-Methyl-n-tridecane Disulfide, dihexadecyl \$ Hexadecyl disulfide \$ 1-(Hexadecyl)disulfany	23883 35659 41691	001560-96-9 001560-96-9 001561-75-7	58 58 49

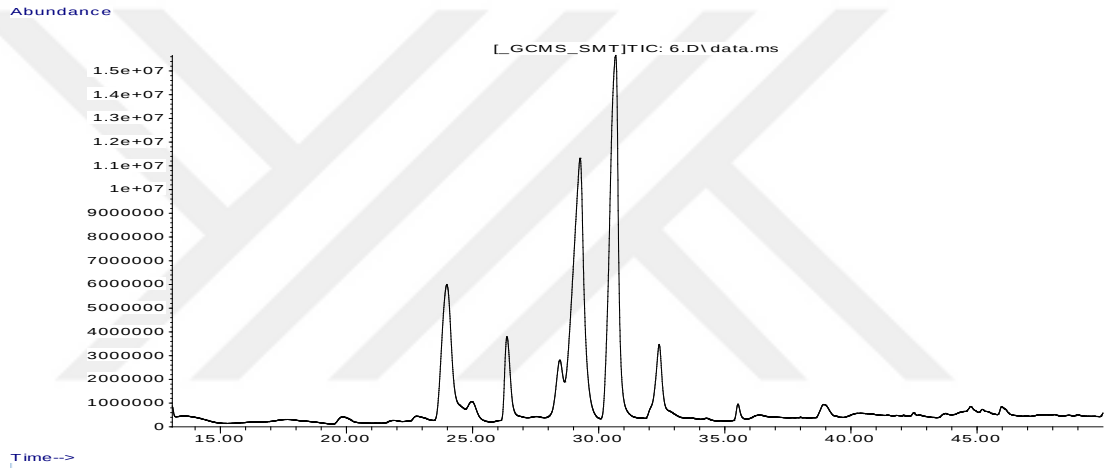
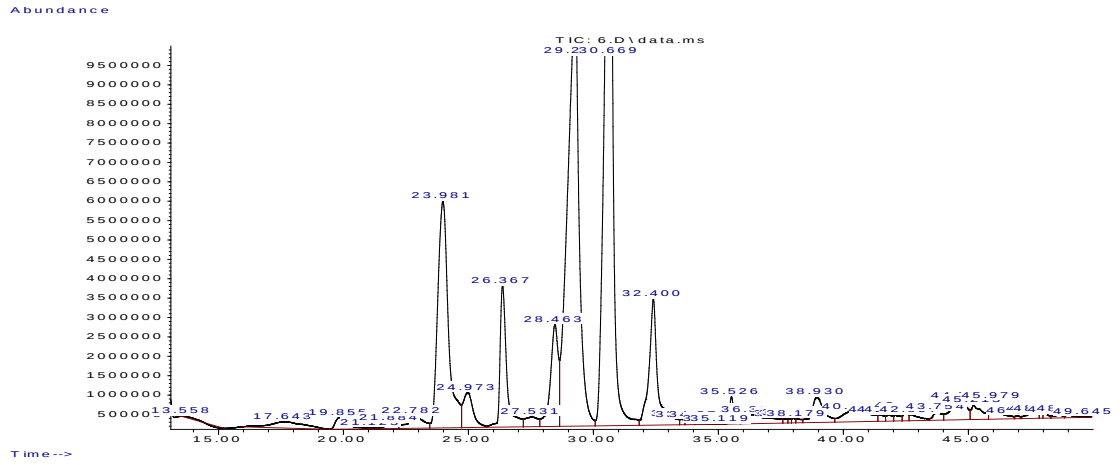
Ek Şekil 82. devamı

35	45.170	0.49	C:\Database\w8N05ST.L CYCLOHEXANE, 1-(1-TETRADECYLPENTAD ECYL)- \$ 15-CYCLOHEXYLNONACOSANE \$ (1-TETRADECYLPENTADECYL)CYCLOHEXA NE # \$ (1-TETRADECYLPENTADECYL)CYC LOHEXANE \$ CYCLOHEXANE, 1- (1-TETR ADECYLPENTADECYL)- \$ NSC 166264 GLYCEROL 1,3-DIHEXANDECANOATE-2- (.DELTA.-9, 12)-OCTADECADIENOATE Cyclohexane, 1-(1-tetradecylpentad ecyl)- \$ 15-cyclohexylnonacosane \$ (1-Tetradecylpentadecyl)cyclohexa ne #	70686	055521-27-2	25
36	45.365	0.51	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 50.47 HENEICOSANE	107 111 110	000629-99-2 000646-31-1 000629-94-7	91 90 47
37	45.925	0.95	C:\Database\w8N05ST.L HEXAHYDRO-N-METHYL-7-METHOXY-1-THI OXOISOINDOLIN-3,5-DIONE 9-Octadecenoic acid, 12-hydroxy-13 -methoxy-, methyl ester \$ Methyl (9E)-12-hydroxy-13-methoxy-9-octade cenoate # 9-OCTADECENOIC ACID, 12-HYDROXY-13 -METHOXY-, METHYL ESTER \$ METHYL (9E)-12-HYDROXY-13-METHOXY-9-OCTADE CENOATE # \$ METHYL (9E)-12-HYDROXY -13-METHOXY-9-OCTADECENOATE \$ METH YL (9E)-12-HYDROXY-13-METHOXY-9-OC TADECENOATE (COMPUTER-GENERATED NA ME)	388647 232956 232180	000000-00-0 075299-48-8 075299-48-8	64 45 45
38	46.909	0.08	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 27.84 ALLYL DECANOATE	107 111 114	000629-99-2 000646-31-1 057856-81-2	83 60 50
39	47.642	0.35	C:\Database\w8N05ST.L Octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate Octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate Pentacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl pentacosanoate #	118236 118238 118225	055682-92-3 055682-92-3 055373-89-2	95 47 42
40	48.002	0.24	C:\Database\w8N05ST.L Octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate Octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate 3-OXOALLOBETUL-1-ENE	118236 118238 287532	055682-92-3 055682-92-3 074892-21-0	91 60 49
41	48.575	0.17	C:\Database\w8N05ST.L 2-FURANNONANOIC ACID, 3-METHYL-5-P ROPYL- \$ 9-(3-METHYL-5-PROPYLFURAN -2-YL)NONANOIC ACID SPIRO[CYCLOHEXANE-1,3'(4'H)-ISOQUI NOLIN]-4'-ONE, 1',2'-DIHYDRO-7'-HY DROXY-6'-METHOXY- \$ 1',2'-DIHYDRO- 7'-HYDROXY-6'-METHOXY-SPIRO[CYCLOH EXANE-1-3'(4'H)-ISOQUINOLIN]-4'-ON GLYCINE, N-[N-(2-HYDROXYBENZOYL)- BETA.-ALANYL]-, METHYL ESTER \$ MET HYL [N-(SALICYL)-3-AMIDEPROPANOYL] -AMINOACETATE	68651 286972 27355	081516-58-7 108439-55-0 118744-44-8	60 49 48
42	48.941	0.13	C:\Database\w8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2 11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Triacontane, 1-bromo- \$ 1-Bromotri acontane #	93053 69555 75215	000000-00-0 000646-31-1 004209-22-7	89 70 64

FAME 2019.M Fri Aug 09 08:13:08 2019

Ek Şekil 82: CFH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 83. devamı



Library Search Report

Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\
 Data File : 6.D
 Acq On : 7 Aug 2019 20:06 (#1); 7 Aug 2019 19:53 (#2)
 Operator :
 Sample : 6
 Misc :
 ALS Vial : 6 sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\w8N05ST.L

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	13.556	0.01	C:\Database\Flavor3.L			
			24.61 TETRADECANE	99	000629-59-4	90
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	87
			40.40 OCTADECANE	103	000593-45-3	86
2	17.642	1.19	C:\Database\Flavor3.L			
			53.54 DOCOSANE	109	000629-97-0	91
			56.48 TRICOSANE	108	000638-67-5	86
			43.92 NONADECANE	104	000629-92-5	80
3	19.856	0.83	C:\Database\Famedb23.L			
			C 14:0	8	000124-10-7	98
			C 16:0	12	000112-39-0	59
			C 12:0	6	000111-82-0	53
4	21.882	0.36	C:\Database\Famedb23.L			
			C 15:0	10	007132-64-1	95
			C 10:0	4	000110-42-9	43
			C 16:0	12	000112-39-0	25
5	22.780	1.01	C:\Database\Flavor3.L			
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	80
			21.90 INDANOL<5-> (=5-HYDROXYINDANE)	865	001470-94-6	43
			56.48 TRICOSANE	108	000638-67-5	30
6	23.982	12.96	C:\Database\Famedb23.L			
			C 16:0	12	000112-39-0	98
			C 15:0	10	007132-64-1	81
			C 14:0	8	000124-10-7	72

Ek Şekil 83. devamı

7	24.972	1.88	C:\Database\Famedb23.L C 16:1 (cis - 9) C 10:0	13 4	001120-25-8 000110-42-9	99 11
8	26.368	4.98	C:\Database\W8N05ST.L Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	383370 383416	000096-76-4 000096-76-4	96 95
9	27.529	0.72	C:\Database\W8N05ST.L Octadecane \$ n-Octadecane \$ octade can EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTE R-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ N SC 62789 HENEICOSANE \$ HENICOSANE \$ HENICOS ANE # \$ AI3-36479 \$ EINECS 211-118 -9 \$ HENICOSANE (COMPUTER-GENERATE D NAME) \$ N-HENEICOSANE	73717 68699 68993	000593-45-3 000112-95-8 000629-94-7	53 53 53
10	28.462	4.29	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 C 14:0 C 16:0	16 8 12	000112-61-8 000124-10-7 000112-39-0	98 93 64
11	29.263	26.63	C:\Database\Famedb23.L C 18:1(cis - 9) (omega 9) C 18:1 (trans - 9) (omega 9) C 16:1 (cis - 9)	18 17 13	000112-62-9 001937-62-8 001120-25-8	99 99 45
12	30.671	28.67	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	19 20 25	002566-97-4 000112-63-0 002463-02-7	99 99 91
13	32.399	5.97	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3)	22 29	000301-00-8 055682-88-7	99 90
14	33.566	0.13	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 36.74 HEPTADECANE 59.33 TETRACOSANE	107 102 111	000629-99-2 000629-78-7 000646-31-1	86 64 50
15	34.270	0.18	C:\Database\W8N05ST.L 1-Chloroeicosane \$ Eicosane, 1-chl oro- \$ 1-Chloroicosane # PENTACOSANE \$ AI3-36478 \$ EINECS 2 11-123-6 \$ N-PENTACOSANE \$ NSC 158 663	74379 69700	042217-02-7 000629-99-2	50 49
16	35.529	0.64	C:\Database\W8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUT YL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYD ROXYPHENYL) PROPIONATE Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1 -dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester \$ Methyl 3-(3,5-di-tert-but yl-4-hydroxyphenyl)propionate \$ Me thyl 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy phenyl)propanoate #	469837 470255	000000-00-0 006386-38-5	99 95
17	36.364	1.13	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 C 14:0	30 8	000929-77-1 000124-10-7	98 38
18	37.674	0.09	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE 47.33 EICOSANE	111 108 105	000646-31-1 000638-67-5 000112-95-8	91 87 80
19	38.000	0.14	C:\Database\Flavor3.L 56.48 TRICOSANE 62.00 PENTACOSANE 32.89 HEXADECANE	108 107 101	000638-67-5 000629-99-2 000544-76-3	93 83 72
20	38.178	0.11	C:\Database\Flavor3.L 56.48 TRICOSANE 59.33 TETRACOSANE 36.74 HEPTADECANE	108 111 102	000638-67-5 000646-31-1 000629-78-7	90 74 72

Ek Şekil 83. devamı

21	38.927	1.56	C:\Database\w8N05ST.L 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 \$ Oleamide \$ Oleic acid amide \$ o leyl amide \$ Slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ A mide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit O 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliph atic amide \$ Armid O \$ cis-9,10-oc tadecenoamide \$ C 9-OCTADECENAMIDE \$ 9-OCTADECENAMID E, (Z)- \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE # \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ (9Z)-9-O CTADECENAMIDE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ (Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ 9-O CTADECENAMIDE, (9Z)- \$ 9-OCTADECEN AMIDE, (Z)- (9CI) \$ 9-OCTADECENOIC ACID, AMIDE (CIS	83152	000301-02-0	98
22	40.392	1.49	C:\Database\Flavor3.L 53.54 DOCOSANE 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE	109 111 107	000629-97-0 000646-31-1 000629-99-2	97 81 81
23	41.462	0.20	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 53.54 DOCOSANE 32.89 HEXADECANE	111 109 101	000646-31-1 000629-97-0 000544-76-3	93 64 59
24	41.806	0.19	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE	107 111 108	000629-99-2 000646-31-1 000638-67-5	93 76 64
25	42.086	0.19	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 50.47 HENEICOSANE	111 107 110	000646-31-1 000629-99-2 000629-94-7	91 91 72
26	42.492	0.22	C:\Database\Flavor3.L 59.33 TETRACOSANE 62.00 PENTACOSANE 36.91 DODECALACTONE<DELTA->	111 107 645	000646-31-1 000629-99-2 000713-95-1	83 83 43
27	42.698	0.29	C:\Database\w8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPU R-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ N SC 62789	74546 68700	000646-31-1 000112-95-8	92 83
28	43.757	0.35	C:\Database\w8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL PENTALENE, OCTAHYDRO-1-(2-OCTYLDEC YL)- \$ 2-(2-OCTYLDECYL)OCTAHYDROPE NTALENE # \$ 2-(2-OCTYLDECYL)-CIS-B ICYCLO (0.3.3) OCTANE \$ 2-(2-OCTYL DECYL)OCTAHYDRO-PENTALENE \$ 2-(2-OC TYLDECYL)OCTAHYDRO-PENTALENE (COMPU TER-GENERATED NAME) \$ PENTALENE	93053 29552	000000-00-0 055401-65-5	83 59
29	44.752	1.33	C:\Database\w8N05ST.L 2,2-DIMETHYL-1-(TRIMETHYLOXIRANYL) -1-PROPANONE	65871	000000-00-0	35
30	45.210	0.76	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 59.33 TETRACOSANE 20.19 TRIDECANE	107 111 98	000629-99-2 000646-31-1 000629-50-5	94 89 38
31	45.977	0.85	C:\Database\w8N05ST.L 9-Octadecenoic acid, 12-hydroxy-13 -methoxy-, methyl ester \$ Methyl (C 9E)-12-hydroxy-13-methoxy-9-octade cenoate #	232956	075299-48-8	70
32	46.967	0.05	C:\Database\w8N05ST.L Tricosane \$ n-Tricosane TRICOSANE \$ AI3-35917 \$ EINECS 211 -347-4 \$ N-TRICOSANE \$ NSC 78487 Tetracosane \$ n-Tetracosane	74446 69376 74559	000638-67-5 000638-67-5 000646-31-1	95 95 90
33	47.762	0.25	C:\Database\w8N05ST.L Octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate OCTACOSANOIC ACID, METHYL ESTER \$ METHYL OCTACOSANOATE \$ EINECS 259- 754-6 \$ OCTACOSANSAEURE, METHYLEST ER Octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate	118236 117666 118238	055682-92-3 055682-92-3 055682-92-3	89 87 87

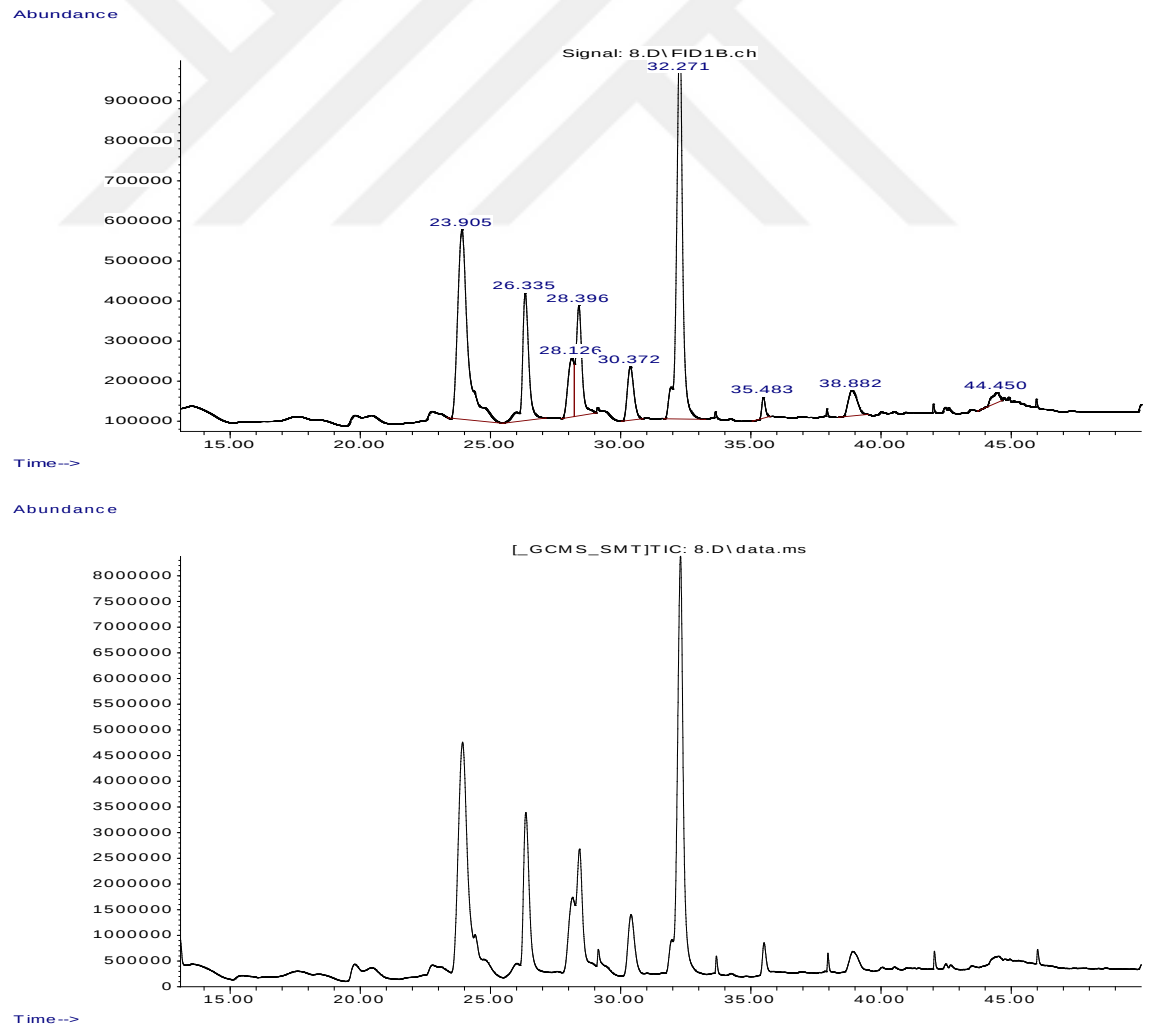
Ek Şekil 83. devamı

34	48.054	0.16	C:\Database\W8N05ST.L Octacosanoic acid, methyl ester \$ Methyl octacosanoate 3-OXOALLOBETUL-1-ENE	118236	055682-92-3	96
			OCTACOSANOIC ACID, METHYL ESTER \$	287532	074892-21-0	50
			METHYL OCTACOSANOATE \$ EINECS 259-754-6 \$ OCTACOSANSAEURE, METHYLESTER	117668	055682-92-3	30
35	48.632	0.10	C:\Database\W8N05ST.L TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298	69555	000646-31-1	59
36	48.992	0.08	C:\Database\W8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 211-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298	93053	000000-00-0	89
				69555	000646-31-1	87

FAME 2019.M Fri Aug 09 08:19:01 2019

Ek Şekil 83: CFH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 84. devamı



Ek Şekil 84. devamı

Library Search Report						
Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\						
Data File : 3.D						
Acq On : 7 Aug 2019 17:23 (#1); 7 Aug 2019 17:10 (#2)						
Operator :						
Sample : 3						
Misc :						
ALS Vial : 3 Sample Multiplier: 1						
Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80						
C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80						
C:\Database\W8N05ST.L						
Unknown Spectrum: Apex						
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e						
Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	16.577	0.26	C:\Database\Flavor3.L			
		47.33	EICOSANE	105	000112-95-8	91
		59.33	TETRACOSANE	111	000646-31-1	91
		53.54	DOCOSANE	109	000629-97-0	91
2	17.602	3.00	C:\Database\Flavor3.L			
		56.48	TRICOSANE	108	000638-67-5	90
		53.54	DOCOSANE	109	000629-97-0	86
		50.47	HENEICOSANE	110	000629-94-7	78
3	20.468	3.74	C:\Database\W8N05ST.L			
		2,3-Dimethyl-undec-1-en-3-ol	145966	999145-96-9	64	
		TRICOSANE, 2-METHYL- \$ 2-METHYLTRI	145269	001928-30-9	64	
		COSANE \$ NSC 138361				
		4-Methyl-1,6-heptadien-4-ol \$ Dial	145636	025201-40-5	58	
		lyl methyl carbinol \$ 4-Methyl-1,6				
		-heptadiene-4-ol \$ 1,6-Heptadien-4				
		-ol, 4-methyl-				
4	22.751	3.15	C:\Database\W8N05ST.L			
		BENZALDEHYDE, 3,4-DIMETHYL- \$ 3,4-	273654	005973-71-7	55	
		DIMETHYLBENZALDEHYDE \$ EINECS 227-				
		770-2				
		Benzaldehyde, 3,5-dimethyl- \$ 3,5-	275001	005779-95-3	55	
		Dimethylbenzaldehyde #				
5	23.930	22.80	C:\Database\Famedb23.L			
		C 16:0	12	000112-39-0	98	
		C 15:0	10	007132-64-1	81	
		C 14:0	8	000124-10-7	72	
5	23.930	22.80	C:\Database\Famedb23.L			
		C 16:0	12	000112-39-0	98	
		C 15:0	10	007132-64-1	81	
		C 14:0	8	000124-10-7	72	
6	26.024	1.49	C:\Database\W8N05ST.L			
		Hexadecanoic acid, 3,7,11,15-tetra	194174	001118-77-0	93	
		methyl-, methyl ester \$ Methyl phy				
		tanate \$ Methyl 3,7,11,15-tetramet				
		hylhexadecanoate #				
		Hexadecanoic acid, 3,7,11,15-tetra	194171	001118-77-0	91	
		methyl-, methyl ester \$ Methyl phy				
		tanate \$ Methyl 3,7,11,15-tetramet				
		hylhexadecanoate #				
7	26.356	8.67	C:\Database\W8N05ST.L			
		Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	383416	000096-76-4	95	
		- \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2				
		,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t-				
		Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter				
		t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3				
		3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$				
		2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol				
		PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)	382338	000096-76-4	95	
		- \$ 2,4-DITERT-BUTYLPHENOL \$ 1-HYD				
		ROXY-2, 4-DI-TERT-BUTYLBENZENE \$ 1				
		-HYDROXY-2,4-DI-TERT-BUTYLBENZENE				
		\$ 2,4 DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ 2,4-BI				
		S(1,1-DIMETHYLETHYL)PHENOL \$ 2,4-B				
		IS(TERT-BUTYL)-PHENOL \$ 2,4-BIS(TE				
		RT-BUTYL)PHENOL \$				
8	27.495	1.38	C:\Database\W8N05ST.L			
		PHENOL, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)- \$	382347	026746-38-3	90	
		DI-TERT-BUTYLPHENOL \$ PHENOL, DI-T				
		ERT-BUTYL-				
9	28.181	5.88	C:\Database\Famedb23.L			
		C 18:0	16	000112-61-8	98	
		C 14:0	8	000124-10-7	93	
		C 16:0	12	000112-39-0	56	
10	28.393	7.77	C:\Database\Famedb23.L			
		C 18:0	16	000112-61-8	95	
		C 14:0	8	000124-10-7	42	
		C 11:0	5	001731-86-8	32	

Ek Şekil 84. devamı

11	29.189	1.44	C:\Database\W8N05ST.L SILANE, TRIMETHYL[(3,7,11,15-TETRA METHYLHEXADECYL)OXY]- \$ 3,7,11,15- TETRAMETHYLHEXADECYL TRIMETHYLSILY L ETHER # \$ 3,7,11,15-TETRAMETHYL- HEXADECANOL TMS ETHER \$ 3,7,11,15- TETRAMETHYL-HEXADECANOL, TRIMETHYL SILYL ETHER \$ 3,7,11,15-TETRAMETHY LHEXADECAN-1-OL T	69942	078695-20-2	38
12	30.402	4.78	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	19 20 25	002566-97-4 000112-63-0 002463-02-7	99 99 90
13	31.031	0.36	C:\Database\W8N05ST.L IRON IODIDE COMPLEX I 5-(2-OXOHEXAHYDRO-1H-THIENO[3,4-D] IMIDAZOL-4-YL)PENTANAMIDE \$ BIOTIN AMIDE HYDROXYMETHAPYRILENE	70999 43525	999071-00-1 006929-42-6	25 12
14	32.301	22.27	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	22 29 27	000301-00-8 055682-88-7 001783-84-3	99 87 47
15	33.509	0.27	C:\Database\W8N05ST.L EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTE R-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ N SC 62789 EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTE R-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ N SC 62789	68700 68698	000112-95-8 000112-95-8	95 92
16	33.720	0.25	C:\Database\W8N05ST.L HEXADECANE, 8-HEXYL-8-PENTYL- \$ 8- HEXYL-8-PENTYLHEXADECANE # \$ 8-HEX YL-8-PENTYLHEXADECANE \$ 8-N-PENTYL -8-N-HEXYLHEXADECANE Hexadecane, 8-hexyl-8-pentyl- \$ 8- Hexyl-8-pentylhexadecane #	70027 74827	055282-29-6 055282-29-6	52 52
17	34.241	0.20	C:\Database\W8N05ST.L Hexadecane, 1-chloro- \$ cetyl chlo ride \$ Hexadecyl chloride \$ 1-Chlo rohexadecane \$ n-Hexadecyl chlorid e \$ Palmityl chloride	73797	004860-03-1	70
18	34.808	0.02	C:\Database\W8N05ST.L Heptadecane, 3-methyl- \$ 3-Methylh eptadecane HENEICOSANE \$ HENICOSANE \$ HENICOS ANE # \$ AI3-36479 \$ EINECS 211-118 -9 \$ HENICOSANE (COMPUTER-GENERATE D NAME) \$ N-HENEICOSANE	73718 68990	006418-44-6 000629-94-7	93 91
19	35.506	0.71	C:\Database\W8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUT YL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYD ROXYPHENYL) PROPIONATE Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1 -dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester \$ Methyl 3-(3,5-di-tert-but yl-4-hydroxyphenyl)propionate \$ Me thyl 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy phenyl)propanoate # 3,4-DIHYDRO-7,12-DIHYDROXY-7,12-DI METHYLBENZ[A]ANTHRACENE	469837 470255 469841	000000-00-0 006386-38-5 000000-00-0	97 93 90
20	35.855	0.31	C:\Database\W8N05ST.L Octadecane, 3-methyl- \$ 3-Methylloc tadecane Heptacosane \$ n-Heptacosane HEPTACOSANE \$ AI3-36283 \$ EINECS 2 09-792-4 \$ N-HEPTACOSANE	73909 74838 70031	006561-44-0 000593-49-7 000593-49-7	93 89 89
21	36.295	0.65	C:\Database\Famedb23.L C 22:0 C 10:0	30 4	000929-77-1 000110-42-9	92 25
22	36.599	0.21	C:\Database\W8N05ST.L EICOSANE \$ ICOSANE \$ ICOSANE # \$ A I3-28404 \$ CCRIS 663 \$ EICOSAN \$ E INECS 204-018-1 \$ ICOSANE (COMPUTE R-GENERATED NAME) \$ N-EICOSANE \$ N SC 62789 Octadecane, 3-methyl- \$ 3-Methylloc tadecane Heptacosane, 1-chloro- \$ 1-Chloroh eptacosane #	68700 73909 75001	000112-95-8 006561-44-0 062016-79-9	95 93 93

Ek Şekil 84. devamı

23	36.907	0.74	C:\Database\Flavor3.L 56.48 TRICOSANE 59.33 TETRACOSANE	108 000638-67-5 87 111 000646-31-1 87
24	37.846	0.42	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 56.48 TRICOSANE 36.74 HEPTADECANE	107 000629-99-2 93 108 000638-67-5 92 102 000629-78-7 91
25	38.006	0.37	C:\Database\W8N05ST.L 1-Bromoeicosane \$ Eicosyl bromide \$ Eicosane, 1-bromo- \$ 1-Bromoicos ane # Octadecane, 9-ethyl-9-heptyl- \$ 9- Ethyl-9-n-heptyloctadecane \$ 9-Eth yl-9-heptyloctadecane #	74702 004276-49-7 47 40294 055282-27-4 38
26	38.899	2.07	C:\Database\W8N05ST.L 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 \$ Oleamide \$ Oleic acid amide \$ o leyl amide \$ Slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ A mide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit o 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliph atic amide \$ Amid O \$ cis-9,10-oc tadecenoamide \$ C	83152 000301-02-0 98
27	39.534	0.41	C:\Database\W8N05ST.L 1,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen-3- ol, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl- (C all-E)- \$ (6E,10E,14E,18E)-2,6,10, 15,19,23-Hexamethyl-1,6,10,14,18,2 2-tetracosahexaen-3-ol #	98636 054159-46-5 56
28	39.837	0.21	C:\Database\W8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL Heptadecane, 3-methyl- \$ 3-Methylh eptadecane	93053 000000-00-0 95 73718 006418-44-6 87
29	40.020	0.48	C:\Database\W8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane Hexadecane, 7,9-dimethyl- \$ 7,9-Di methylhexadecane HEXADECANE, 7,9-DIMETHYL- \$ 7,9-DI METHYLHEXADECANE	74546 000646-31-1 96 73703 021164-95-4 91 68144 021164-95-4 91
30	40.507	0.39	C:\Database\W8N05ST.L 1-Chloroeicosane \$ Eicosane, 1-chl oro- \$ 1-Chloroicosane #	74379 042217-02-7 93
31	41.159	0.41	C:\Database\W8N05ST.L OCTADECANE \$ AI3-06523 \$ CCRIS 681 \$ EINECS 209-790-3 \$ N-OCTADECANE \$ NSC 4201 \$ OCTADECAN HEXACOSANE \$ EINECS 211-124-1 \$ N- HEXACOSANE \$ NSC 122457 Nonadecane \$ n-Nonadecane	68157 000593-45-3 94 69894 000630-01-3 93 73892 000629-92-5 90
32	41.451	0.32	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 47.33 EICOSANE	107 000629-99-2 93 105 000112-95-8 53
33	42.097	0.38	C:\Database\Flavor3.L 47.33 EICOSANE 62.00 PENTACOSANE 36.74 HEPTADECANE	105 000112-95-8 83 107 000629-99-2 83 102 000629-78-7 64
34	42.481	0.38	C:\Database\W8N05ST.L Tetracosane \$ n-Tetracosane Tetracosane \$ n-Tetracosane Hexanoic acid, but-3-yn-2-yl ester	74546 000646-31-1 92 74558 000646-31-1 81 190129 999190-13-2 58
35	43.482	0.30	C:\Database\W8N05ST.L (22-Z)-DEHYDROCHOLESTEROL-1-ETHER CYCLODODECANONE, 2-(PHENYLTHIO)- \$ 2-(PHENYLTHIO)CYCLODODECANONE \$ 2 -PHENYLTHIOCYCLODODECANONE \$ NSC 2 49776	70182 000000-00-0 55 56361 052190-43-9 50
36	44.363	1.59	C:\Database\W8N05ST.L D-HOMOPREGNAN-20-ONE, (5.ALPHA.)- \$ 1-(10A,12A-DIMETHYLOCTADECALHYDRO -1-CHRYSENYL)ETHANONE # \$ 1-(10A,1 2A-DIMETHYLOCTADECALHYDRO-1-CHRYSEN YL)ETHANONE \$ D-HOMOPREGNAN-20-ONE	492803 032318-95-9 42
37	44.747	0.38	C:\Database\W8N05ST.L 4a(2H)-Phenanthrenemethanol, 1,3,4 9,10,10a-hexahydro-6-methoxy-1,1- dimethyl-7-(1-methylethyl)-, (4aR- trans)- \$ 12-Methoxyabieta-8,11,13 -trien-20-ol # 4A(2H)-PHENANTHRENEMETHANOL, 1,3,4 9,10,10A-HEXAHYDRO-6-METHOXY-1,1- DIMETHYL-7-(1-METHYLETHYL)-, (4AR- TRANS)- \$ 12-METHOXYABIETA-8,11,13 -TRIEN-20-OL # \$ 12-METHOXYABIETA- 8,11,13-TRIEN-20-OL \$ 12-O-METHYLF ERRUGINOL-17-OL	493092 057397-36-1 64 492781 057397-36-1 64

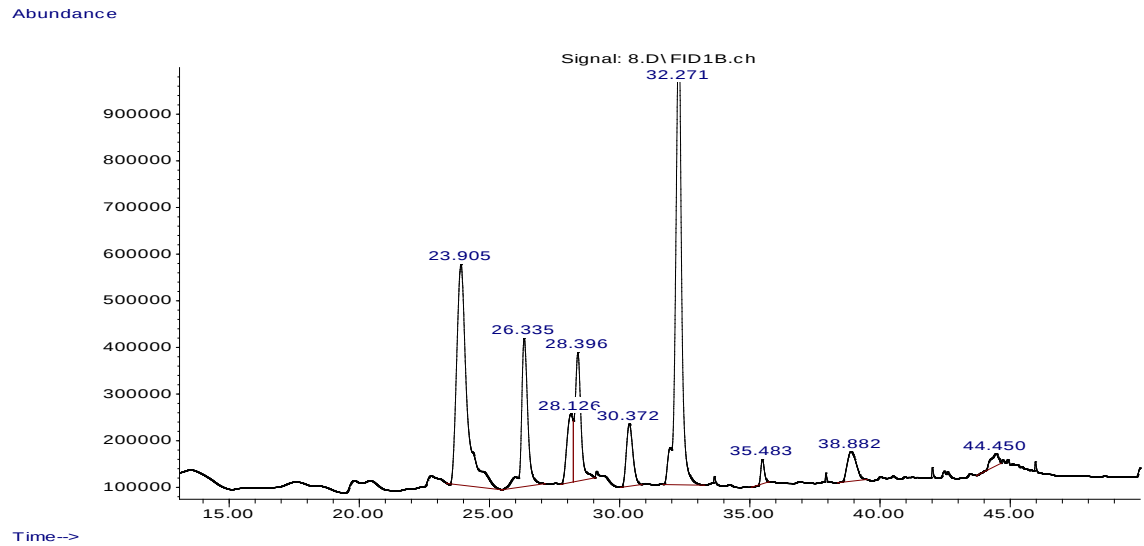
Ek Şekil 84. devamı

38	44.935	0.34	C:\Database\w8N05ST.L 6H-NAPHTHO[2',3':4,5]FURO[3,2-C]CH ROMENE-6,7,12-TRIONE 4H-1-BENZOPYRAN-4-ONE, 3,5,7-TRIHY	492827	999492-84-1	38
39	45.124	0.46	C:\Database\w8N05ST.L Benzaldehyde, 4-methoxy-, (2,4-din itrophenyl)hydrazone \$ p-Anisaldehy de, (2,4-dinitrophenyl)hydrazone \$ p-Methoxybenzaldehyde 2,4-dinitr ophenylhydrazone \$ 4-Methoxybenzal dehyde (2,4-dinitrophenyl)hydrazon e #	492665	000480-19-3	30
40	45.473	0.44	C:\Database\w8N05ST.L DOTRIACONTANE \$ AI3-52367 \$ BICETY L \$ BRN 1783260 \$ EINECS 208-881-5 \$ N-DOTRIACONTANE \$ NSC 6361 \$ TR IS(TRIMETHYLSILYL)ETHER, METHYL ES TER OF ETHYL ANTHRANILATE AZO PIGM ENT(.ALPHA.Z) OF BILIVUBIN-1X.ALPH A. 2-O-ACYL GLUCURONIDE Butanoic acid	493046	001773-49-5	30
41	46.063	0.16	C:\Database\w8N05ST.L 3-METHYLHENEICOSANE \$ 3-METHYLHENIC OSANE # \$ 3-METHYLHENEICOSANE \$ 3- METHYLHENEICOSANE (COMPUTER-GENERAT ED NAME) \$ HENEICOSANE, 3-METHYL- Tetratriacontane, 1-bromo- \$ 1-Bro motetratriacontane #	70507	000544-85-4	45
42	48.626	0.06	C:\Database\w8N05ST.L TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2 11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298 Tetracosane \$ n-Tetracosane	69209	006418-47-9	32
43	49.627	0.07	C:\Database\w8N05ST.L Pentacosane \$ n-Pentacosane TETRACOSANE \$ AI3-52698 \$ EINECS 2 11-474-5 \$ N-TETRACOSANE \$ NSC 298	75283	062108-50-3	32
				69558	000646-31-1	96
				74559	000646-31-1	96
				74645	000629-99-2	78
				69555	000646-31-1	60

FAME 2019.M Fri Aug 09 08:16:15 2019

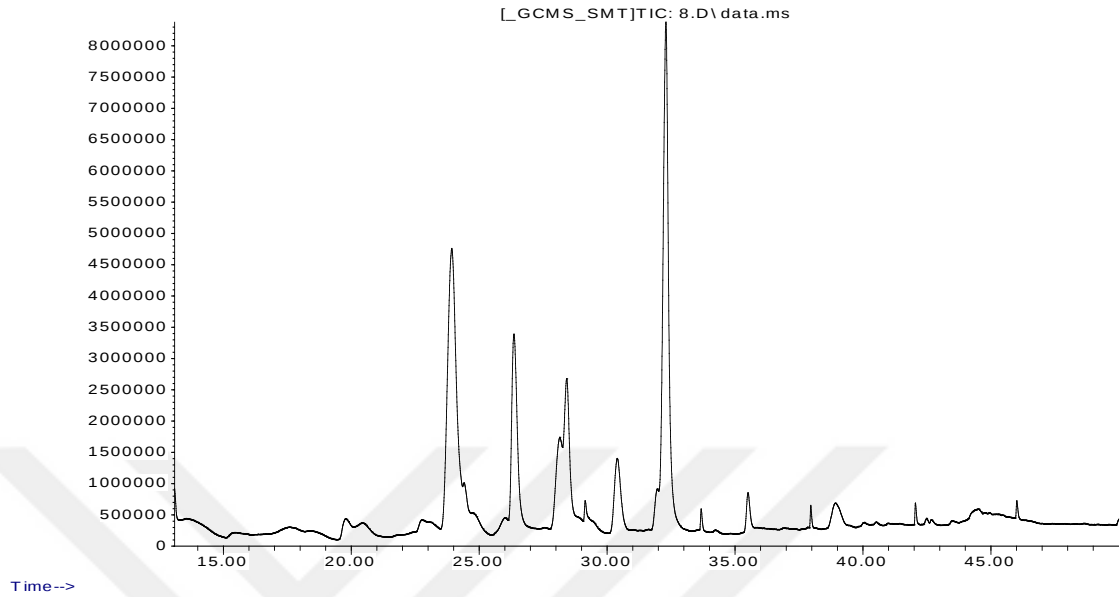
Ek Şekil 84: CPH numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.

Ek Şekil 85. devamı



Ek Şekil 85. devamı

Abundance



Library Search Report

Data Path : D:\inan dursun\07082019fame\
 Data File : 8.D
 Acq On : 7 Aug 2019 21:55 (#1); 7 Aug 2019 21:41 (#2)
 Operator :
 Sample : 8
 Misc :
 ALS Vial : 8 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\Flavor3.L Minimum Quality: 80
 C:\Database\w8N05ST.L

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	13.573	0.10	C:\Database\Flavor3.L			
			47.33 EICOSANE	105	000112-95-8	87
			24.61 TETRADECANE	99	000629-59-4	87
			53.54 DOCOSANE	109	000629-97-0	83
2	15.456	0.44	C:\Database\w8N05ST.L			
			ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE # 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOPHENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYPHOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399	066564-08-7	74
3	15.948	0.04	C:\Database\Flavor3.L			
			40.40 OCTADECANE	103	000593-45-3	95
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	76
4	16.388	0.04	C:\Database\Flavor3.L			
			59.33 TETRACOSANE	111	000646-31-1	90
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	87
			43.92 NONADECANE	104	000629-92-5	87
5	16.789	0.01	C:\Database\Flavor3.L			
			56.48 TRICOSANE	108	000638-67-5	91
			50.47 HENEICOSANE	110	000629-94-7	91
			62.00 PENTACOSANE	107	000629-99-2	91
6	19.787	1.56	C:\Database\Famedb23.L			
			C 14:0	8	000124-10-7	98
			C 16:0	12	000112-39-0	53

Ek Şekil 85. devamı

7	20.434	1.95	C:\Database\W8N05ST.L 4-PROPYLBUTAN-4-OLIDE 2(3H)-Furanone, dihydro-5-propyl- \$.gamma.-Heptanolactone \$.gamma.- -Heptalactone \$.gamma.-Propiobuty- rolactone \$.gamma.-Propyl-.gamma.- -butyrolactone \$.gamma.-Hydroxyheptanoic acid lactone \$.gamma.-heptalato- ne \$.gamma.-Heptanoic-.gamma.-lactone \$ 4 -Hydroxyheptanoic	144019 145666	000000-00-0 000105-21-5	64 59
8	21.990	0.32	C:\Database\Flavor3.L 53.54 DOCOSANE 59.33 TETRACOSANE 56.48 TRICOSANE	109 111 108	000629-97-0 000646-31-1 000638-67-5	91 91 91
9	22.797	1.76	C:\Database\W8N05ST.L Benzaldehyde, 2,4-dimethyl- \$ 2,4- Dimethylbenzaldehyde \$ 2,4-Dimethy- lbenzenecarboxaldehyde Benzaldehyde, 3,4-dimethyl- \$ 3,4-	275013 275014	015764-16-6 005973-71-7	86 70
10	23.060	1.14	C:\Database\W8N05ST.L PENTACOSANE \$ AI3-36478 \$ EINECS 2 11-123-6 \$ N-PENTACOSANE \$ NSC 158 663 Benzaldehyde, 3,5-dimethyl- \$ 3,5- Dimethylbenzaldehyde # BENZALDEHYDE, 3,4-DIMETHYL- \$ 3,4- DIMETHYLBENZALDEHYDE \$ EINECS 227- 770-2	69700 275001 273654	000629-99-2 005779-95-3 005973-71-7	38 38 38
11	23.930	21.39	C:\Database\Famedb23.L C 16:0 C 14:0 C 15:0	12 8 10	000112-39-0 000124-10-7 007132-64-1	98 64 53
12	24.411	4.20	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL 3-FORMYLPROPIONATE Tetrahydropyranyl ether of citrone llo1 Valeric acid, but-3-yn-2-yl ester	2331 146072 145756	000000-00-0 999146-07-5 999145-75-9	47 41 38
13	26.013	1.24	C:\Database\W8N05ST.L Hexadecanoic acid, 3,7,11,15-tetra- methyl-, methyl ester \$ Methyl phy- tanate \$ Methyl 3,7,11,15-tetramet- hylhexadecanoate #	194174	001118-77-0	94
14	26.362	10.82	C:\Database\W8N05ST.L Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t- Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter- t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	383416	000096-76-4	95
15	27.552	0.61	C:\Database\W8N05ST.L Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- - \$ Phenol, 2,4-di-tert-butyl- \$ 2 ,4-Di-tert-butylphenol \$ 2,4-di-t- Butylphenol \$ 1-Hydroxy-2,4-di-ter- t-butylbenzene \$ Antioxidant No. 3 3 \$ Prodox 146 \$ Prodox 146A-85X \$ 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol	383416	000096-76-4	70
16	28.153	5.01	C:\Database\Famedb23.L C 18:0 C 14:0 C 16:0	16 8 12	000112-61-8 000124-10-7 000112-39-0	98 93 56
17	28.422	8.76	C:\Database\W8N05ST.L 9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (Z,Z,Z)- \$ (9E,12E,15E)-9,12,15-Octadeca- trien-1-ol # 7,10,13-Hexadecatrienoic acid, met- hyl ester \$ Methyl (7E,10E,13E)-7, 10,13-hexadecatrienoate # 7,10,13-HEXADECATRIENOIC ACID, MET HYL ESTER \$ METHYL (7E,10E,13E)-7, 10,13-HEXADECATRIENOATE # \$ METHYL (7E,10E,13E)-7,10,13-HEXADECATRIE- NOATE \$ METHYL 7 10 13 HEXADECATRI- ENOATE	130210 130209 129002	000506-44-5 056554-30-4 056554-30-4	92 90 90
18	29.148	2.14	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORY- L)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP- ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP- HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP- HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2E)- 3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D- IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE 6-AZA-5,7,12,14-TETRATHIAPENTACENE	507399 507397	066564-08-7 000000-00-0	83 64

Ek Şekil 85. devamı

19	30.401	4.40	C:\Database\Famedb23.L C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6) C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6) C 20:2 (cis - 11,14) (omega 6)	19	002566-97-4	99
				20	000112-63-0	99
				25	002463-02-7	90
20	31.008	0.47	C:\Database\W8N05ST.L IRON IODIDE COMPLEX I 4-ACETYL-1-HEXADECYL-3-HYDROXY-5-P HENYL-1,5-DIHYDRO-2H-PYRROL-2-ONE \$ 4-ACETYL-1-HEXADECYL-3-HYDROXY-5 -PHENYL-1,5-DIHYDRO-PYRROL-2-ONE	70999 30990	999071-00-1 999030-99-2	25 10
21	31.620	0.28	C:\Database\W8N05ST.L 4-Cholest-3-one semicarbazone \$ cholest-4-en-3-one semicarbazone # 4-ACETYL-1-HEXADECYL-3-HYDROXY-5-P HENYL-1,5-DIHYDRO-2H-PYRROL-2-ONE \$ 4-ACETYL-1-HEXADECYL-3-HYDROXY-5 -PHENYL-1,5-DIHYDRO-PYRROL-2-ONE	41198 30990	020817-69-0 999030-99-2	25 11
22	32.301	25.61	C:\Database\Famedb23.L C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15) (omega 3) C 20:3 (cis-11,14,17) (omega 3) C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	22 29 27	000301-00-8 055682-88-7 001783-84-3	99 87 47
23	33.680	0.75	C:\Database\W8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORY L)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2 E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399	066564-08-7	90
24	34.241	0.21	C:\Database\W8N05ST.L Hexadecane, 1-bromo- \$ n-Hexadecyl bromide \$ n-Hexadecyl-1-bromide \$ Cetyl bromide \$ Hexadecyl bromide \$ 1-Bromohexadecane \$ 1-Hexadecyl bromide	74263	000112-82-3	38
25	35.511	1.19	C:\Database\W8N05ST.L METHYL ESTER OF 3-(3,5-DI-TERT-BUT YL-4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONIC ACID \$ METHYL-3-(3,5-DITERTBUTYL-4-HYD ROXYPHENYL) PROPIONATE	469837	000000-00-0	99
26	35.883	0.14	C:\Database\W8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL Tetracosane \$ n-Tetracosane Cyclohexene, 4-(4-ethoxycyclohexyl)-1-pentyl-	93053 74546 59974	000000-00-0 000646-31-1 999059-97-6	90 53 50
27	36.942	0.11	C:\Database\Flavor3.L 62.00 PENTACOSANE 40.40 OCTADECANE 59.33 TETRACOSANE	107 103 111	000629-99-2 000593-45-3 000646-31-1	93 78 64
28	37.966	0.45	C:\Database\W8N05ST.L 1,3,3,3-TETRAMETHYLDISILOXANYL TRI S(TRIMETHYLSILYL) ORTHOSILICATE # \$ 1,1,1,5,7,7,7-HEPTAMETHYL-3,3-BI S(TRIMETHYLSILOXY)TETRAILOXANE \$ 1,3,3,3-TETRAMETHYLDISILOXANYL TRI S(TRIMETHYLSILYL) ORTHOSILICATE	111706	038147-00-1	40
29	38.927	2.03	C:\Database\W8N05ST.L 9-Octadecenamide, (Z)- \$ Adogen 73 \$ Oleamide \$ Oleic acid amide \$ O leyl amide \$ Slip-eze \$ Armoslip C P \$ Crodamide O \$ Crodamide OR \$ A mide O \$ Diamide O 200 \$ Diamit O 200 \$ (Z)-9-Octadecenamide \$ Aliph atic amide \$ Armid O \$ cis-9,10-Oc tadecenoamide \$ C 9-OCTADECENAMIDE \$ 9-OCTADECENAMID E, (Z)- \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE # \$ (9Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ (9Z)-9-O CTADECENAMIDE (COMPUTER-GENERATED NAME) \$ (Z)-9-OCTADECENAMIDE \$ 9-O CTADECENAMIDE, (9Z)- \$ 9-OCTADECEN AMIDE, (Z)- (9CI) \$ 9-OCTADECENOIC ACID, AMIDE (CIS	83152 81667	000301-02-0 000301-02-0	98 92
30	40.054	0.24	C:\Database\W8N05ST.L 2,5-DIMETHYL-4-METHOXYPHENOL Tetracosane \$ n-Tetracosane	93053 74546	000000-00-0 000646-31-1	92 86
31	40.524	0.23	C:\Database\W8N05ST.L Nonadecane \$ n-Nonadecane Kaur-16-en-18-oic acid, 6-hydroxy- 7-oxo-, .gamma.-lactone, (4.alpha. ,6.alpha.)- \$ Kaur-16-en-18-oic ac id, 6.alpha.-hydroxy-7-oxo-, .gamm a.-lactone \$ 7-Oxokaurenoide \$	73892 288236	000629-92-5 019794-40-2	95 90

Ek Şekil 85. devamı

38	43.493	0.11	C:\Database\w8N05ST.L HEPTANOIC ACID, 7-(O-PENTYLPHENYL) -, METHYL ESTER \$ METHYL 7-(2-PENTYLPHENYL)HEPTANOATE \$ METHYL 7-(2-PENTYLPHENYL)HEPTANOATE # \$ METHYL 7-(2'-PENTYLPHENYL)HEPTANOATE E-11-Tetradecen-1-ol difluoroaceta te	11356 013397-97-2 53 14438 999014-43-9 52
39	44.518	0.82	C:\Database\w8N05ST.L Pregn-20-en-3-ol, 20-methyl-, (3.b eta., 5.alpha.)- 2-(2-Phenoxythiiny)imidazo[1,2- a]pyridine \$ 2-(2-Phenoxathiiny)im idazo[1,2-a]pyridine #	493014 054411-87-9 64 493029 109534-27-2 64
40	44.764	0.13	C:\Database\w8N05ST.L Imidazo[1,2-b]1,2,4-triazine, 6-(4 -methoxyphenyl)-7-methyl-2-phenyl- \$ Methyl 4-(7-methyl-2-phenylimid azo[1,2-b][1,2,4]triazin-6-yl)phen yl ether # 4A(2H)-PHENANTHRENEMETHANOL, 1,3,4 ,9,10,10A-HEXAHYDRO-6-METHOXY-1,1- DIMETHYL-7-(1-METHYLETHYL)-, (4AR- TRANS)- \$ 12-METHOXYABIETA-8,11,13 -TRIEN-20-OL # \$ 12-METHOXYABIETA- 8,11,13-TRIEN-20-OL \$ 12-O-METHYLF ERRUGINOL-17-OL	493100 094103-49-8 76 492781 057397-36-1 68
41	44.952	0.12	C:\Database\w8N05ST.L 4a(2H)-Phenanthrenemethanol, 1,3,4 ,9,10,10A-HEXAHYDRO-6-methoxy-1,1- dimethyl-7-(1-methylethyl)-, (4AR- trans)- \$ 12-Methoxyabieta-8,11,13 -trien-20-ol # 4A(2H)-PHENANTHRENEMETHANOL, 1,3,4 ,9,10,10A-HEXAHYDRO-6-METHOXY-1,1- DIMETHYL-7-(1-METHYLETHYL)-, (4AR- TRANS)- \$ 12-METHOXYABIETA-8,11,13 -TRIEN-20-OL # \$ 12-METHOXYABIETA- 8,11,13-TRIEN-20-OL \$ 12-O-METHYLF ERRUGINOL-17-OL	493092 057397-36-1 89 492781 057397-36-1 89
31	40.524	0.23	C:\Database\w8N05ST.L Nonadecane \$ n-Nonadecane Kaur-16-en-18-oic acid, 6-hydroxy- 7-oxo-, .gamma.-lactone, (4.alpha. ,6.alpha.)- \$ Kaur-16-en-18-oic ac id, 6.alpha.-hydroxy-7-oxo-, .gamm a.-lactone \$ 7-Oxokaurenolide \$	73892 000629-92-5 95 288236 019794-40-2 90
32	40.987	0.14	C:\Database\w8N05ST.L Tricosane \$ n-Tricosane TRICOSANE \$ AI3-35917 \$ EINECS 211 -347-4 \$ N-TRICOSANE \$ NSC 78487 Nonadecane \$ n-Nonadecane	74446 000638-67-5 95 69376 000638-67-5 95 73892 000629-92-5 95
33	41.290	0.05	C:\Database\w8N05ST.L PENTACOSANE \$ AI3-36478 \$ EINECS 2 11-123-6 \$ N-PENTACOSANE \$ NSC 158 663 PENTACOSANE \$ AI3-36478 \$ EINECS 2 11-123-6 \$ N-PENTACOSANE \$ NSC 158 663 Pentacosane \$ n-Pentacosane	69708 000629-99-2 94 69700 000629-99-2 94 74657 000629-99-2 94
34	41.445	0.08	C:\Database\w8N05ST.L 4-({[(2-ISOPROPYL-5-METHYLPHENOXY) ACETYL]HYDRAZONO}METHYL)BENZOIC AC ID \$ ACETHYDRAZIDE, 2-(2-ISOPROPYL -5-METHYLPHENOXY), N2-(4-CARBOXYBE NZYLIDENO)- Nonadecane \$ n-Nonadecane	311215 999311-21-8 91 73892 000629-92-5 89
35	42.057	0.31	C:\Database\w8N05ST.L ETHYL (2E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORY L)-4-(DIMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROP ENOATE # \$ 3-(4-N,N-DIMETHYLAMINOP HENYL)PROPENOIC ACID, 2-(DIETHOXYP HOSPHINYL)-, ETHYL ESTER \$ ETHYL (2 E)-3-[2-(DIETHOXYPHOSPHORYL)-4-(D IMETHYLAMINO)PHENYL]-2-PROPENOATE	507399 066564-08-7 93
36	42.492	0.18	C:\Database\w8N05ST.L Hexanoic acid, but-3-yn-2-yl ester Hexanoic acid, 3-chloroprop-2-enyl ester BENZENE-D5, BUTOXY- \$ BUTYL PHENYL -D5 ETHER \$ N-BUTYL PHENYL-D5 ETHE	190129 999190-13-2 55 190278 999190-28-1 53 188404 073833-93-9 49

```

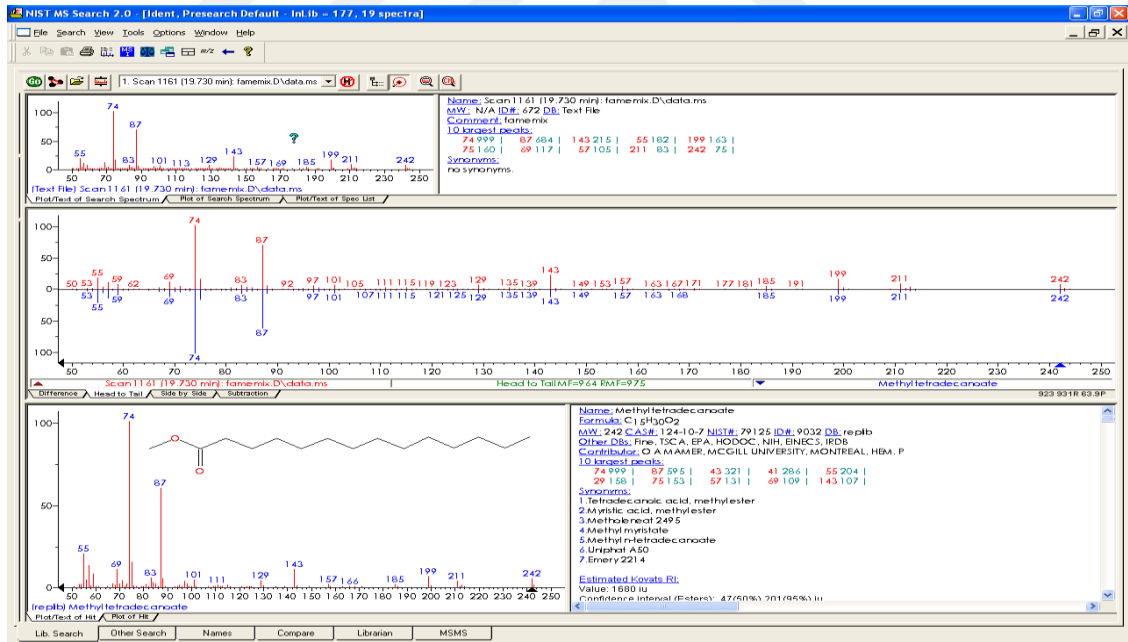
42  46.022  0.17 C:\Database\W8N05ST.L
      1,3,3,3-TETRAMETHYLDISILOXANYL TRI 111706 038147-00-1 58
      S(TRIMETHYLSILYL) ORTHOSILICATE #
      $ 1,1,1,5,7,7,7-HEPTAMETHYL-3,3-BI
      S(TRIMETHYLSILOXY)TETRAILOXANE $
      1,3,3,3-TETRAMETHYLDISILOXANYL TRI
      S(TRIMETHYLSILYL) ORTHOSILICATE
      Heptasiloxane, hexadecamethyl- $ H 422001 000541-01-5 52
      exadecamethylheptasiloxane $ 1,1,1
      ,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,13-He
      xadecamethylheptasiloxane #

43  48.672  0.06 C:\Database\W8N05ST.L
      2-PROPENOIC ACID, 2-AZIDO-3-[4-[(1 287091 115070-23-0 52
      ,1-DIMETHYL-2-PROPYNYL)OXY]PHENYL]
      -, METHYL ESTER $ METHYL 2-AZIDO-3
      -[4-(1,1-DIMETHYLPROP-2-YNLOXY)PH
      ENYL]PROPENOATE
      4-([2-(2,2-DIMETHYL-4-PHENYLTETRA 287447 999287-45-0 42
      HYDRO-2H-PYRAN-4-YL)-3-HYDROXYPROP
      YL]AMINO}METHYL)-2-METHOXYPHENOL $
      4-([2-(2,2-DIMETHYL-4-PHENYL-TETR
      AHYDRO-PYRAN-4-YL)-3-HYDROXY-PROPY
      LAMINO]-METHYL)-2-METHOXY-PHENOL

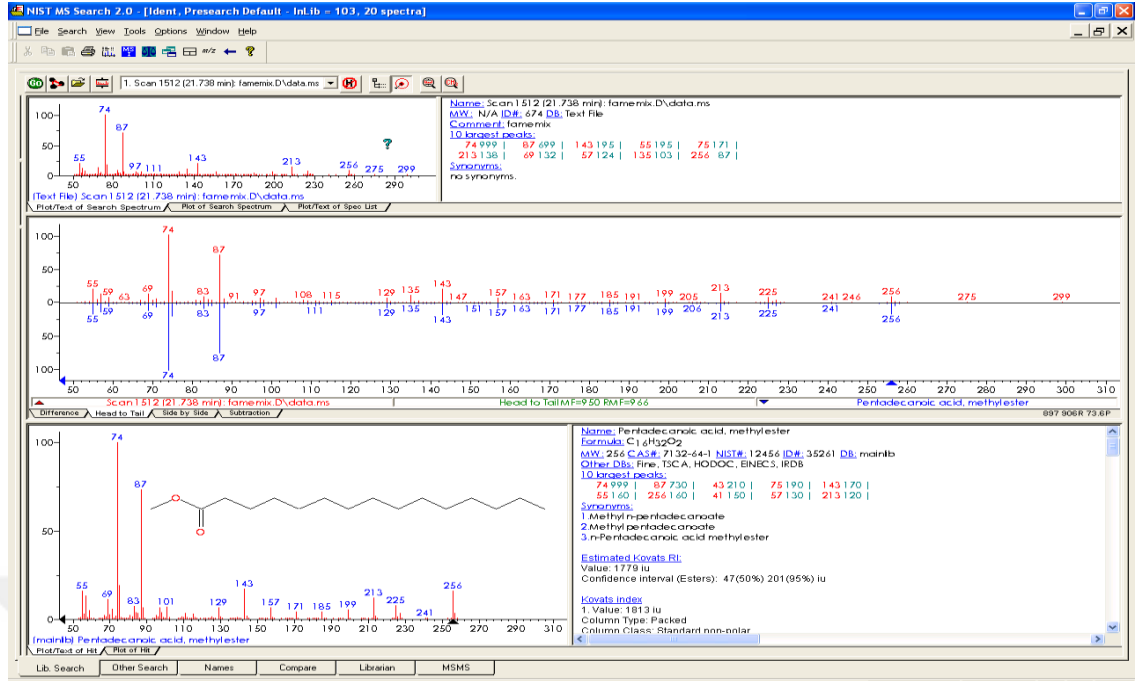
FAME 2019.M Fri Aug 09 08:20:51 2019

```

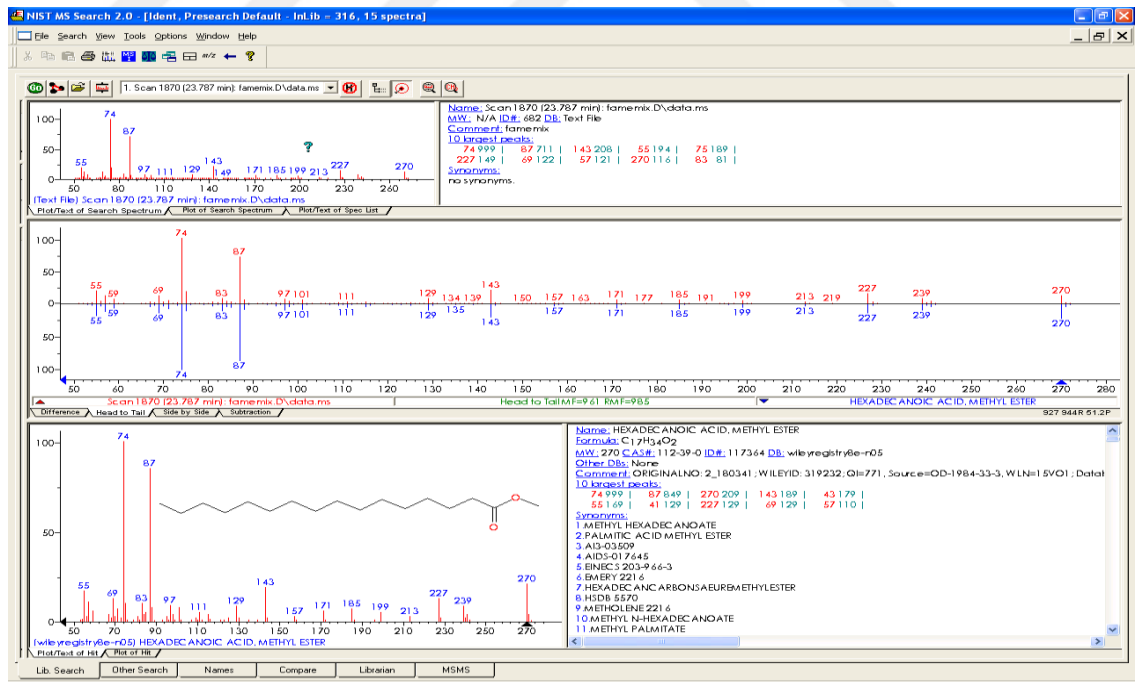
Ek Şekil 85: CPL numunesine ait GC-MS analizinden elde edilen kromatogram ve kütüphane taraması sonuçları.



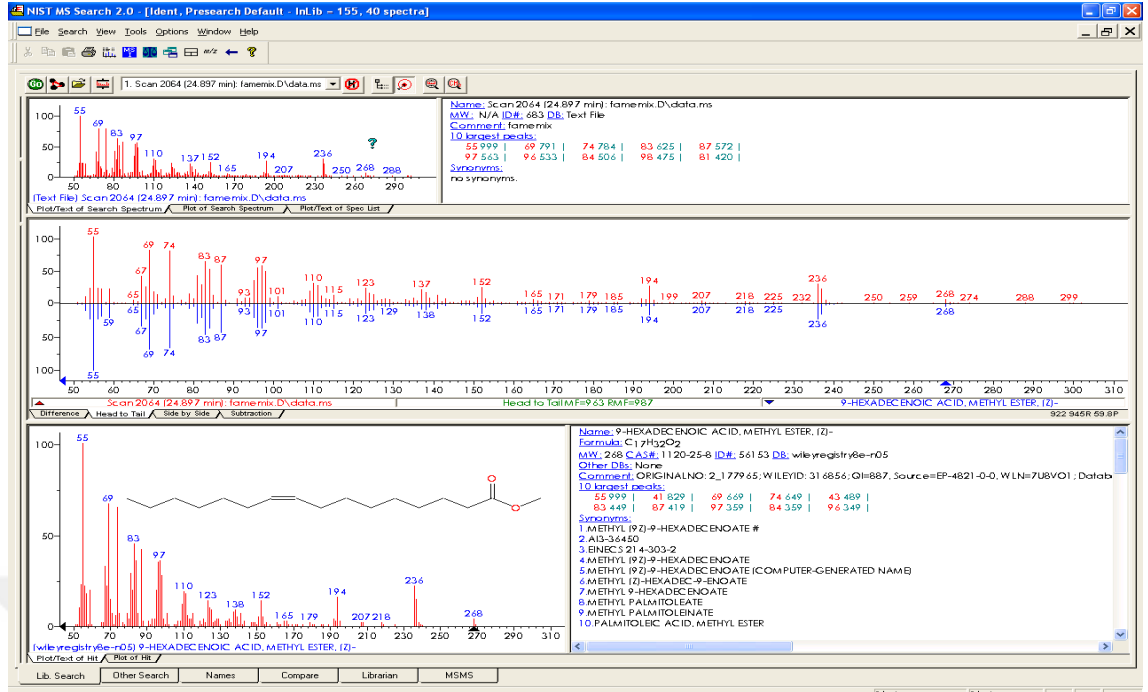
Ek Şekil 86: Miristik asit metil esteri (C 14:0)GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.



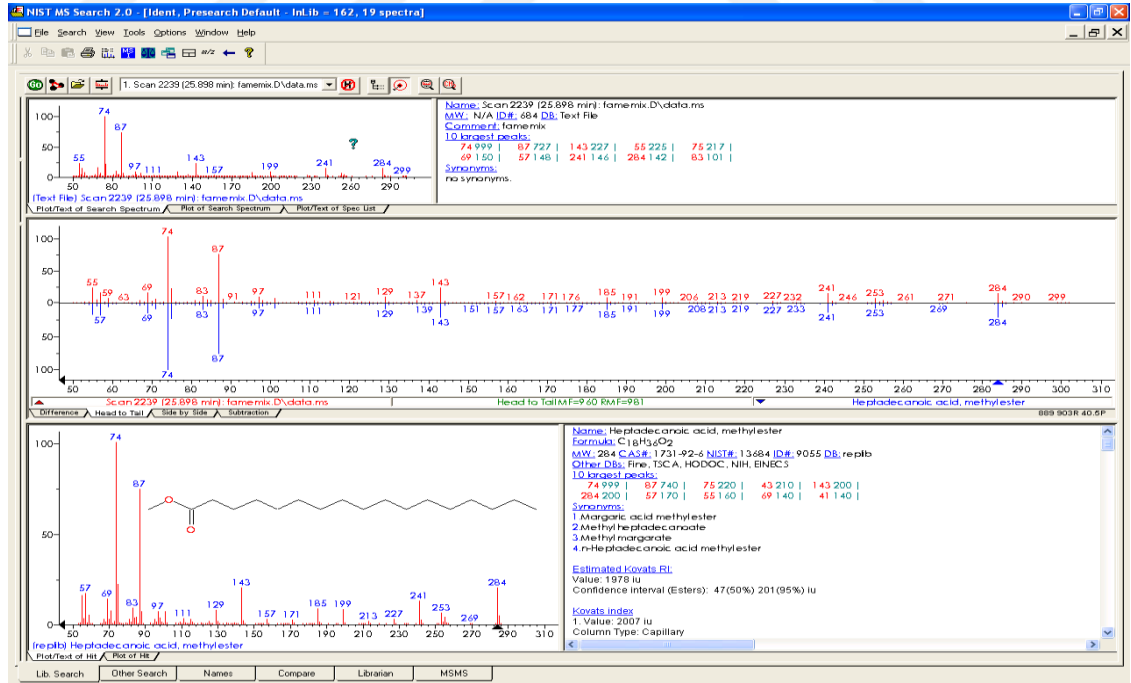
Ek Şekil 87: Pentadekanoik asit metil esterin (C15:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.



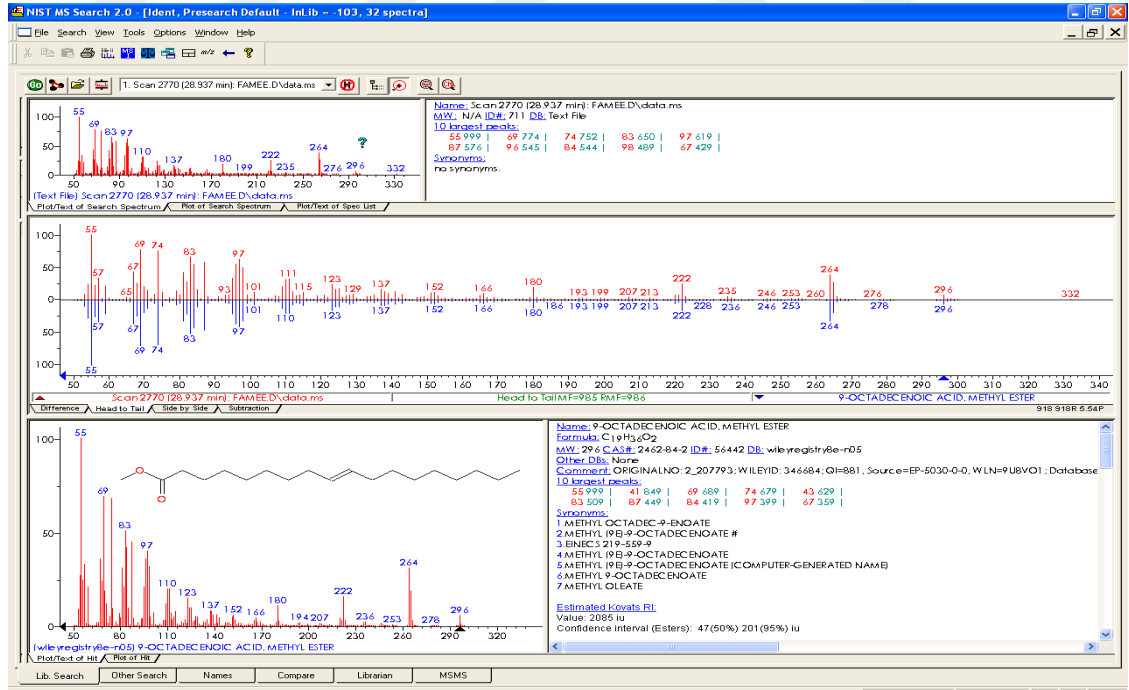
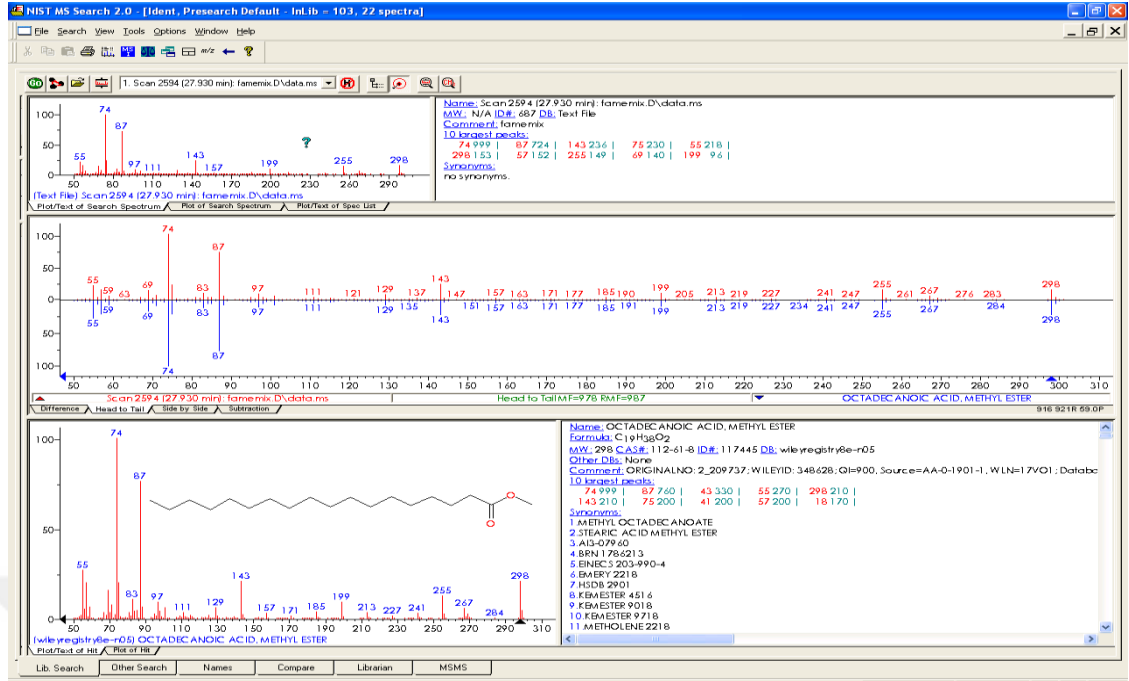
Ek Şekil 88: Palmitik asit metil esterin (C16:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.

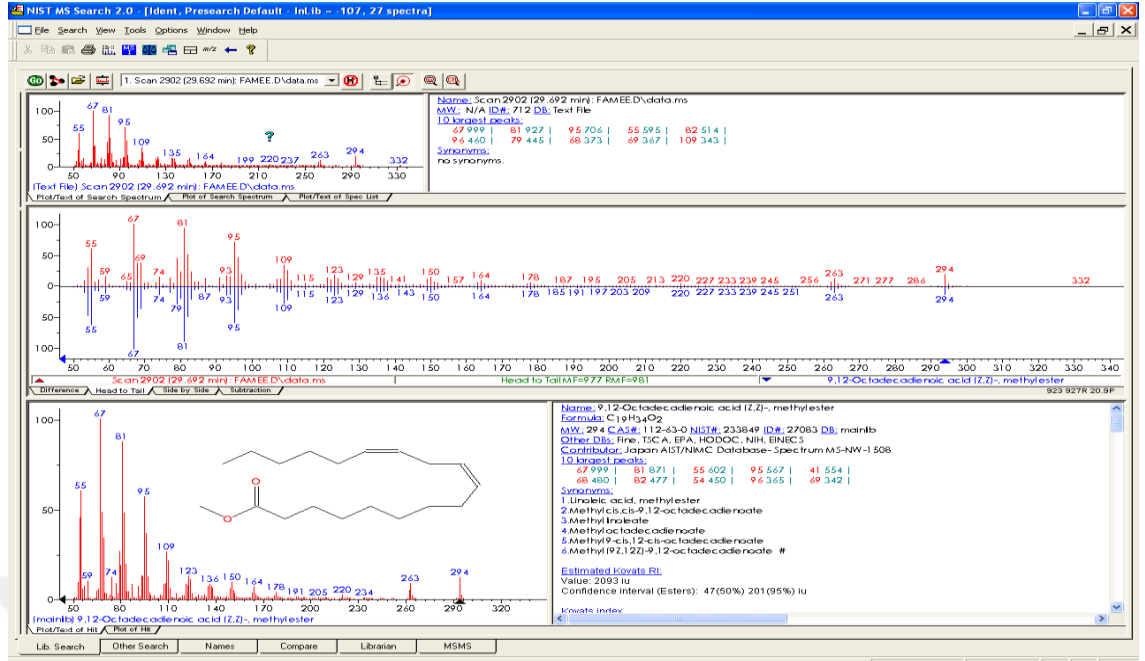


Ek Şekil 89: Palmitoleik asit metil ester (C16:1) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.

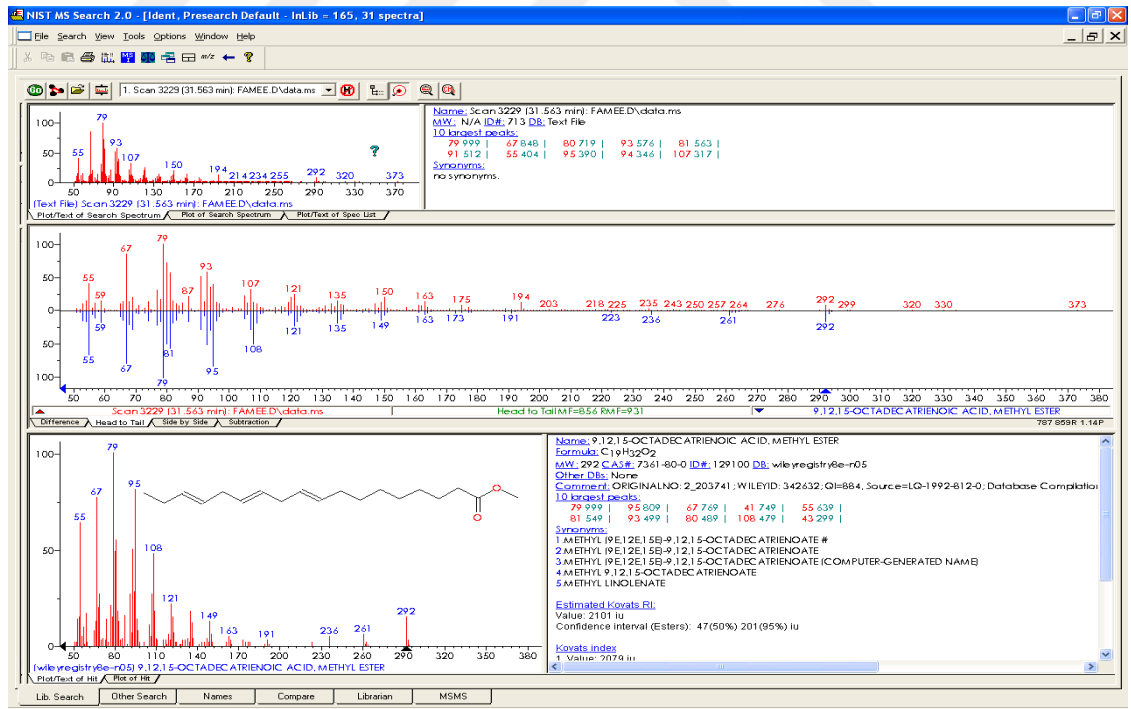


Ek Şekil 90: Margarik asit metil esterinin (C17:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.

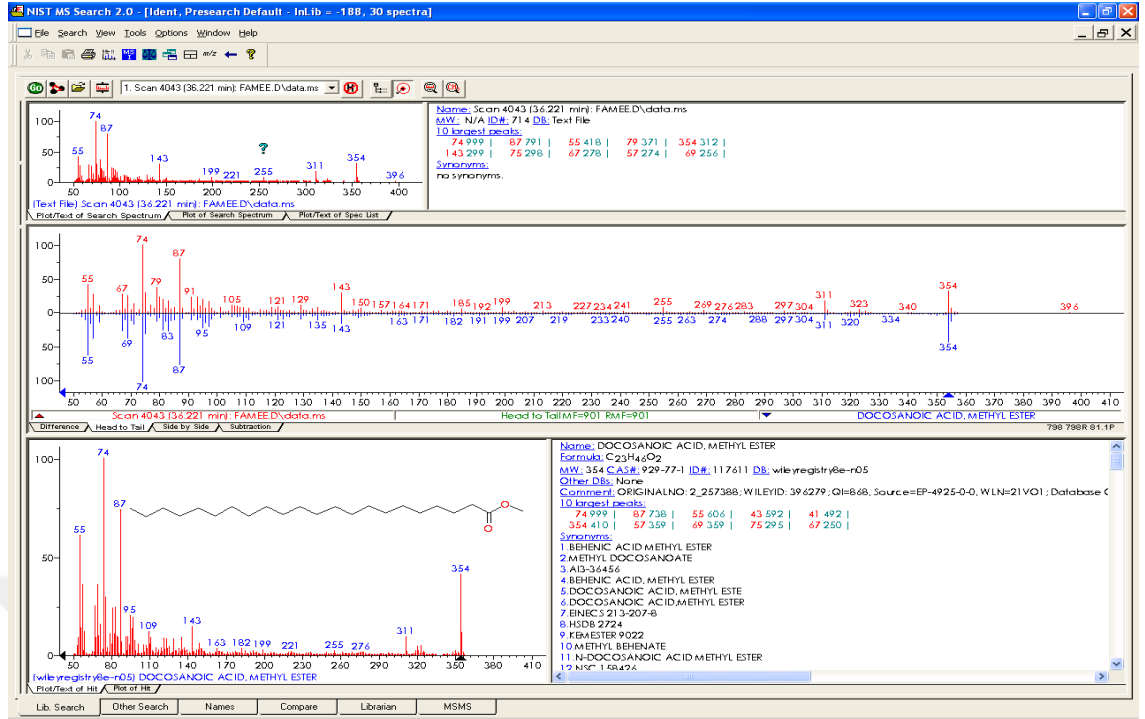




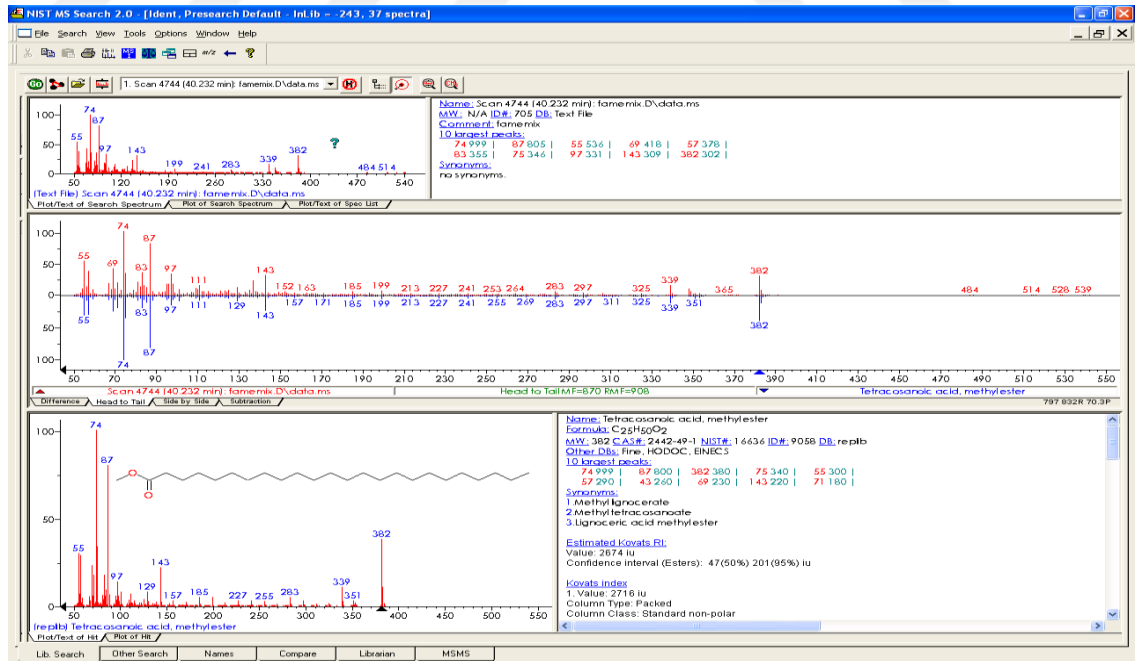
Ek Şekil 93: Linoleik asit metil ester (C18:2) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.



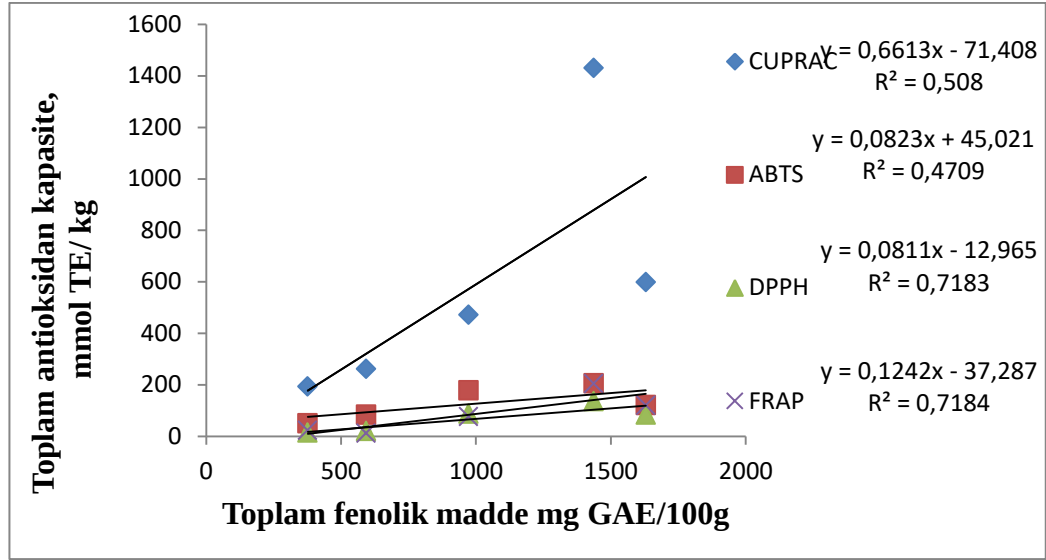
Ek Şekil 94: Linolenik asit metil ester (C18:3) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.



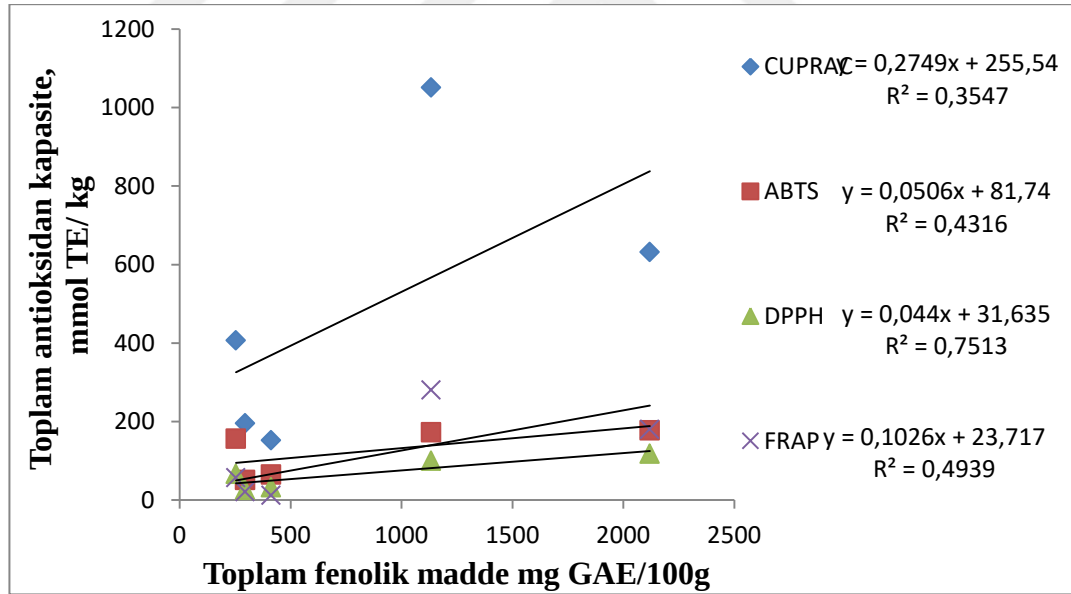
Ek Şekil 95: Behenik asit metil ester (C22:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.



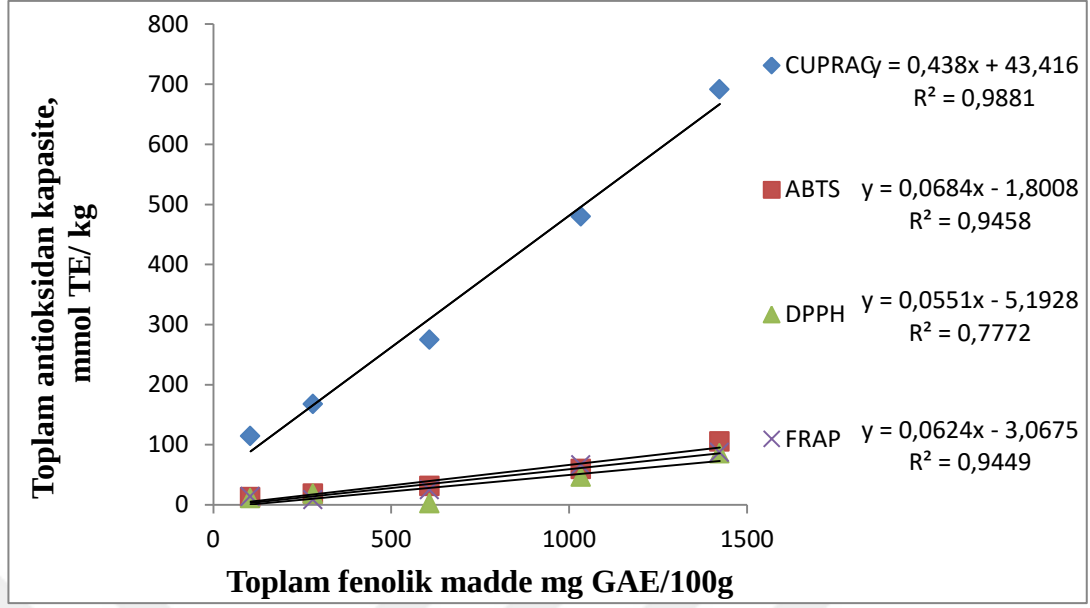
Ek Şekil 96: Lignocerik asit metil esterin (C24:0) GC-MS ile analizinden elde edilen kütle spektrumu.



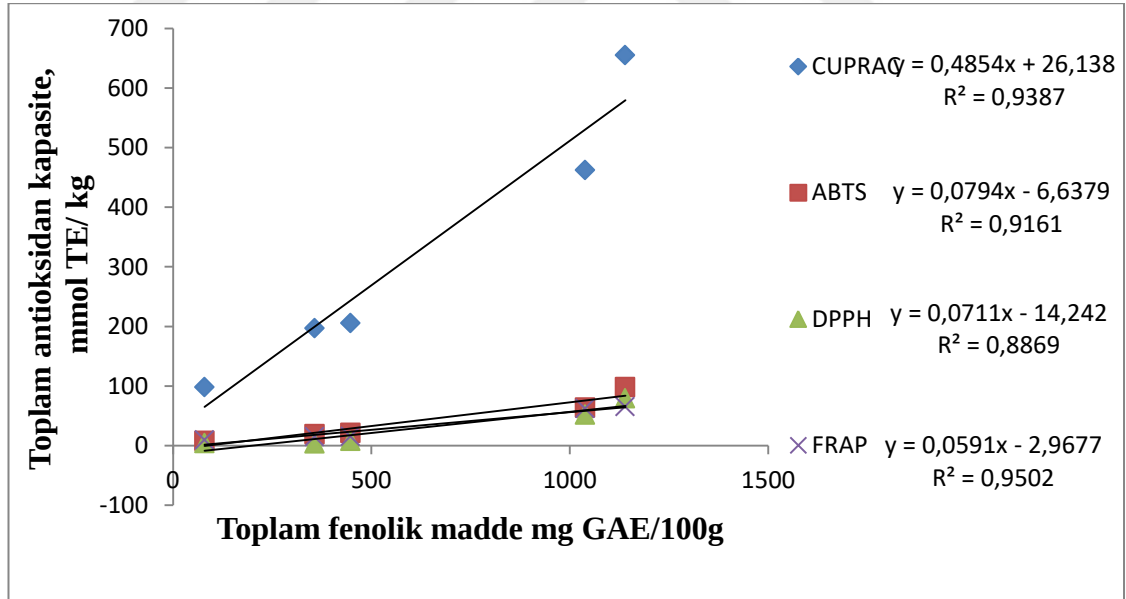
Ek Şekil 97: Havada kurutulmuş numunelerin SE E:S (1:1) ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.



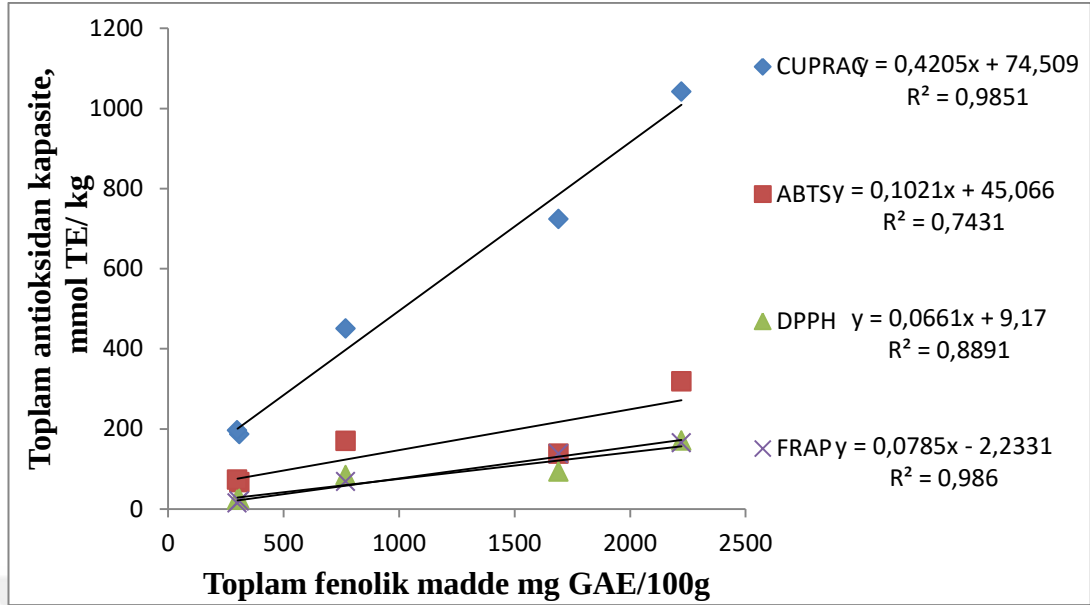
Ek Şekil 98: Liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin SE E:S(1:1) ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.



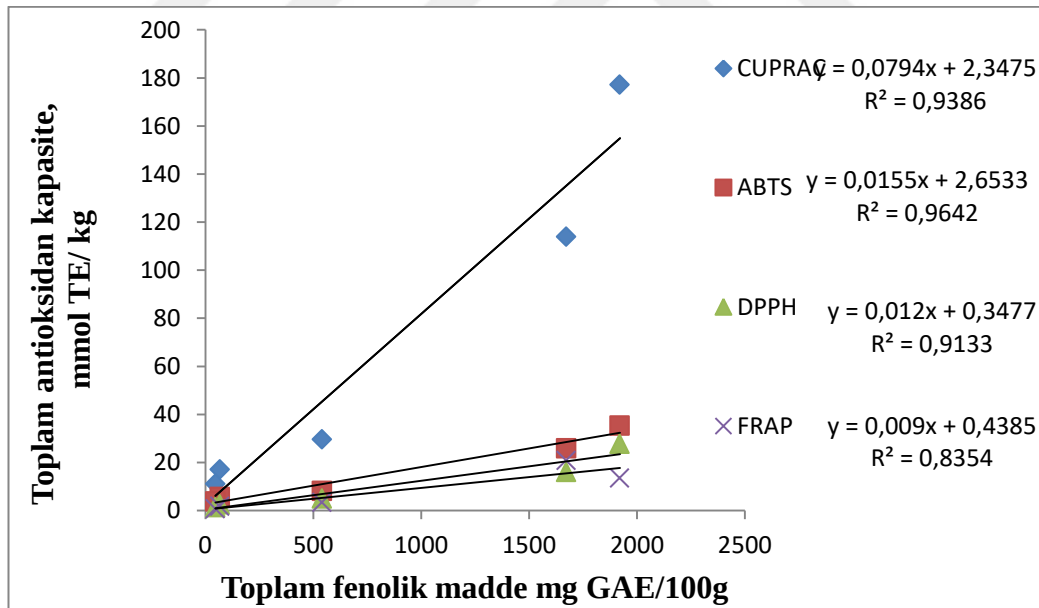
Ek Şekil 99: Havada kurutulmuş numunelerin SE E ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.



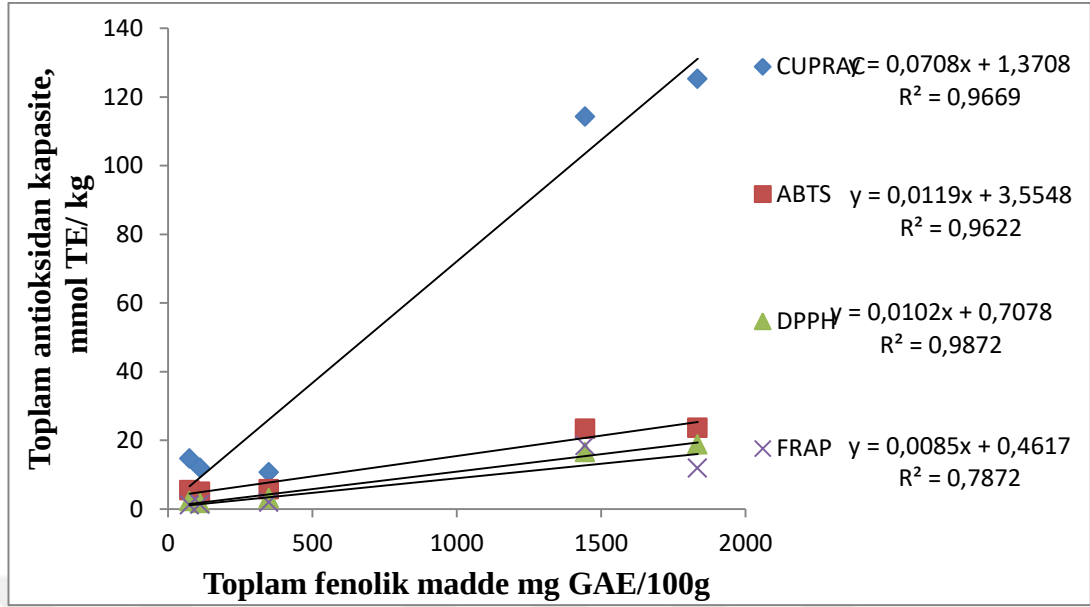
Ek Şekil 100: Liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin SE E ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.



Ek Şekil 101: Liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin UDE E:S (1:1) ekstraksiyonunun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.



Ek Şekil 102: Havada kurutulmuş numunelerin ASE E:S (1:1) ekstraksiyonunun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.



Ek Şekil 103: Liyofilizatörde kurutulmuş numunelerin ASE E:S (1:1) ekstraksiyonun CUPRAC, ABTS, DPPH ve FRAP testlerine göre toplam antioksidan aktivite-toplam fenolik madde ilişkisi.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İnan DURSUN
Dogum Yeri : Selim
Dogum Tarihi : 15.04.1984
Medeni Hali : : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (e-posta) : inan36dursun@gmail.com/idursun@bingol.edu.tr

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kars Fen Lisesi (1999-2002)

Lisans : Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
(2003-2007)

Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim
Dalı Analitik Kimya Bilim Dalı (2008-2011)

Doktora : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim
Dalı Analitik Kimya Bilim Dalı (2013- Devam etmekte)

Çalıştığı Kurum ve Yıl : Özel Ders Dersanesi İĞDIR (2008-2010),

Kars Kavram Dersanesi KARS (2010-2011)

Özel Boğaziçi Lisesi KARS (2014-2017)

Kars Çözüm Dershanesi KARS(2017-2017)

Bingöl Üniversitesi Rektörlük (Pilot Üniversite Koordinasyon

Merkez (PİKOM) Birimi / Merkezı Laboratuvar Uygulama ve

Araştırma Merkez’inde Görevli) Öğretim Görevlisi (2018-)

1. Akdeniz F., Akyüz, E., Yucayurt G., **Dursun İ.**, Burnaz, N.A., Güneş F., Gökçe G., Akgül S., Küçük M., “Phenolic compositions of leaves, barks and stems of common rhododendron and cherry laurel”, 6th aegean analytical chemistry days, OP 28 Denizli, Turkey 9-12 october (2008).
2. Akdeniz F., Yucayurt G., Gökçe G., **Dursun İ.**, Küçük M., Akyüz E., Güneş F., Akgül S., “A kinetic study on the antioxidant activities of supercritical extracts from rhododendron and Lourocerasus species’ leaves”, 6th aegean analytical chemistry days, PPI018, Denizli, Turkey 9-12 october (2008).
3. Akdeniz F., **Dursun İ.**, Tepebaş K., Şuekinci D.; “Determination and comparison of antioxidant activities of the extracts from dried fruits of laurocerasus officinalis roem. Via different extraction” 10th ISOPS International symposium on Pharmaceutical Sciences, June 26-29, ,Ankara, Turkey (2012).
4. Vural N. , Akdeniz F. , **Dursun İ.** , Tepebaş K. , “Antioxidant Activities of the Extracts from *Anemone albana* Stev by Different Extraction Techniques”, 6th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 10-14 September, Trabzon, Turkey, (2013).
5. **Dursun İ.**, Atalar M. N., Dursun Y. A., Çağlayan N., “Bingöl’de Üretilen Arı Ekmeğinin (Perga) Toplam Fenolik Madde, Antioksidan Aktivite Tayini ve HPLC yöntemiyle Fenolik Bileşik Profilinin Belirlenmesi” Uluslararası Arıcılık Araştırmaları & Sürdürülebilir Kırsal Kalkınma Stratejileri Kongresi, 11-13 Ekim 2019, Bingöl, Türkiye (Sözlü Sunum).
6. Şahin İ., **Dursun İ.** ve Şahin E. A, “Bingöl Çiçek Balının Alüminyumun Korozyona Karşı Korunmasında Kullanılması” Uluslararası Arıcılık Araştırmaları & Sürdürülebilir Kırsal Kalkınma Stratejileri Kongresi, 11-13 Ekim 2019, Bingöl, Türkiye (Sözlü Sunum).
7. **Dursun İ.**, Dursun Y. A., Atalar M. N., Çağlayan N. “Bingöl Merkez ve İlçelerinde Üretilen Balların Toplam Fenolik Madde İçeriği, Antioksidan Aktivite Tayini ve Fenolik Bileşiklerinin HPLC Yöntemiyle Analizi” Uluslararası Arıcılık Araştırmaları & Sürdürülebilir Kırsal Kalkınma Stratejileri Kongresi, 11-13 Ekim 2019, Bingöl, Türkiye (Sözlü Sunum).
8. Ürüşan Z., Arıcı B., Yazdıç F., **Dursun İ.**, İzol E., Gün R., Çiçek İ. “Bingöl İli ve İlçelerinde Üretilen Balların Uçucu Bileşenler ve Yağ Asitlerinin Gc-MS İle Belirlenmesi” Uluslararası Arıcılık Araştırmaları & Sürdürülebilir Kırsal Kalkınma Stratejileri Kongresi, 11-13 Ekim 2019, Bingöl, Türkiye (Sözlü Sunum).
9. İzol E., **Dursun İ.**, Gün R., Çiçek İ., Yazdıç F., Ürüşan Z., Arıcı B., “Bingöl İli ve İlçelerinde Üretilen Balların Bazı Metal Konsantrasyonlarının ICP-MS İle

Belirlenmesi” Uluslararası Arıcılık Araştırmaları & Sürdürülebilir Kırsal Kalkınma Stratejileri Kongresi, 11-13 Ekim 2019, Bingöl, Türkiye (Sözlü Sunum)

Ulusal Bildiriler

1. Akdeniz F., Dursun, İ., Tepebaş K., Özbay H., Kekeç L., Yıldız S., “Kurutulmuş *Diospyros lotus* L. Meyvelerinden Farklı Tekniklerle Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktiviteleri Açısından Karşılaştırılması” XXIV. *Ulusal Kimya Kongresi*, Zonguldak, (2010).
2. Dursun İ., Akdeniz F., Burnaz N.A., Küçük M., “Farklı Çözücü Yüzdelğinde Hazırlanan *Butomus umbellatus* ve *Sparganium emersum* Bitki Ekstraktlarının RP-LC-UV-DAD ile Fenolik Bileşiklerinin Belirlenmesi” XXV. *Uluslararası katılımlı Ulusal Kimya Kongresi, Biyokimya poster sunumu*, Erzurum, (2011)
3. Pınar F., Çavlan L., Arı L., Samancı Ö., Dursun İ., Tepebaş K., Vural N., Biçil M., Akdeniz F., “Tırşik otundan (*arum dioskoridis sm*) elde edilen ekstraktların fenolik madde içeriğinin ve antioksidan aktivitelerinin tayini” XI. *Ulusal Analitik Kimya Kongresi* Hatay, (2012).
4. Tepebaş K., Akdeniz F., Dursun İ., “*Lathyrus rotundifolius willd.* Bitkisinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerlerinin tayini” XI. *Ulusal Analitik Kimya Kongresi* Hatay, (2012)