

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

SİYAH ÇAYIN TRİTERPENİK ASİT İÇERİĞİ



YÜKSEKLİSANS TEZİ

Burak İPEKÇİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**TEMMUZ 2016
SAMSUN**



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

SİYAH ÇAYIN TRİTERPENİK ASİT İÇERİĞİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Burak İPEKÇİ
(12210085)**

Tezin Savuma Tarihi : Temmuz 2016

Tez Danışmanı : Doç. Dr.İlkay KOCA

Bu Yüksek Lisans Tez alışması Ondokuz Mayıs niversitesiPYO.MUH.1904.13.011'nolu Proje ile Desteklenmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
(Gıda Mühendisliği) Anabilim Dalında
(Burak İpekci) Tarafından Hazırlanan

SIYAH ÇAYIN TRİTERPENİK ASİT İÇERİĞİ

başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 14/07/2016 tarihinde yapılan sınav ile
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. İlkay KOCA
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Feza GEYİKÇİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Zuhale OKÇU
Gümüşhane Üniversitesi



....../....../2016

Prof. Dr. Hüseyin DEMİR
Enstitü Müdürü





Anneme ve babama,

ÖNSÖZ

Çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren ve her zaman teşvik eden değerli hocam Doç. Dr. İlkey KOCA'ya ve çalışmamda yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi Şeyda BOSTANCI' ya teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin sağlanmasında yardımcı olan değerli meslektaşım Mustafa BİLSEL'e teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca bana hep destek olan eşim Gözdecan ONAN'a teşekkür ederim.

Beni lisansüstü öğrenim konusunda teşvik eden, her zaman yanımda olan annem Elmas İPEKÇİ ve ablam Firdevs İPEKÇİ'ye teşekkür ederim.

Temmuz 2016

Burak İPEKÇİ

Gıda Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xi
1.GİRİŞ	1
1.1.Tezin Amacı	2
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	4
2.1.Çay Bitkisi ve Özellikleri	4
2.1.1. Siyah çay ve özellikleri	6
2.2.Terpenler ve Genel Özellikleri	8
2.2.1.Hemiterpenler.....	11
2.2.2.Monoterpenler	11
2.2.3.Seskiterpenler	12
2.2.4.Diterpenler.....	13
2.2.5.Sesterpenler	14
2.2.6.Triterpenler.....	14
2.2.6.1. Pentasiklik terpenler	16
2.2.6.1.1. Ursolik asit ve genel özellikleri.....	18
2.2.6.1.2. Oleanolik asit ve genel özellikleri.....	18
2.2.6.1.3. Ursolik ve oleanolik asitlerin sağlık üzerine etkileri	19
2.2.7.Tetraterpenler	21
2.2.8.Politerpenler	22
2.3. Konu ile İlgili Yapılan Çalışmalar	26
3.MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	39
3.1. Materyal	39
3.2. Yöntemler	41
3.2.1.Kuru madde tayini	41
3.2.2.Triterpenik asitlerin ekstraksiyonu.....	41
3.2.3.Triterpenik asit tayini	41
3.2.3.1. Ursolik asit çözeltilerinin hazırlanması	42
3.2.3.2. Oleanolik asit çözeltilerinin hazırlanması	43
3.3. İstatiksel Analizler	44
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	46
4.1. Çözücü Seçimi	46
4.2. Siyah Çayın Triterpenik Asit İçeriği	47
4.3. Farklı Kampanya Döneminde İşlenen Siyah Çayların Triterpenik Asit İçeriği..	54
5.SONUÇLAR	57
6.KAYNAKLAR.....	58
7.EKLER	65
ÖZGEÇMİŞ.....	70

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1.Çay yaprağındaki ana bileşenlerin kompozisyonu	6
Çizelge 2.2.Yeşil ve siyah çay yaprağının ortalama kompozisyonu.....	6
Çizelge 2.3.Terpenlerin sınıflandırılması.....	10
Çizelge 2.4.Bazı triterpenlerin karakterizasyonu	15
Çizelge 2.5. Ursolik asit ve türevlerinin in vitro koşullarda kanser önleyici etkileri	23
Çizelge 2.6. Ursolik asit ve türevlerinin in vivo antikanser etkileri	25
Çizelge 4.1. Yerli siyah çayların triterpenik asit içeriği.....	48
Çizelge 4.2. İthal siyah çayların triterpenik asit içeriği	49
Çizelge 4.3. İthal yeşil çayların triterpenik asit içeriği	50



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Farklı çayların üretim aşamaları	5
Şekil 2.2. Kateşinlerden teaflavin ve tearubiginin oluşumu	7
Şekil 2.3. İzopren yapısı ve baş-kuyruk bağlanma şekilleri.....	9
Şekil 2.4. Monoterpen omurgasını üretmek için iki izopren biriminin baş-kuyruk birleşiminin şematik gösterimi	10
Şekil 2.5. Temsili hemiterpenler	11
Şekil 2.6. Bazı monoterpenlerin kimyasal yapıları	12
Şekil 2.7. Peril alkol, karveol, sobrerol ve uroterpenolün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.8. Seskiterpenler sınıfında yer alan farnezolün kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.9.Lupan, oleanan ve ursan triterpenlerinin moleküler yapıları	14
Şekil 2.10.Lupeol (1), lupenil katyon, oleanil katyon ve damarenil katyonunun (I) biyosentezi	17
Şekil 2.11.Oleanil katyonundan ursolik asit (4) ve oleanolik asidin (5) biyosentezi	17
Şekil 2.12.Ursolik asidin yapısı	18
Şekil 2.13.Oleanolik asidin yapısı.....	19
Şekil 2.14.Karoten olarak tanımlanan ve bilinen yedi son grup	22
Şekil 3.1.Çalışmada kullanılan yerli siyah çay numuneleri	39
Şekil 3.2.Çalışmada kullanılan ithal siyah çay numuneleri	39
Şekil 3.3.Çalışmada kullanılan ithal yeşil çay numuneleri	40
Şekil 3.4.Kampanya süresince alınan siyah çay numuneleri	40
Şekil 3.5.Çalışmada kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı.....	42
Şekil 3.6.Ursolik asite ait kalibrasyon grafiği.....	42
Şekil 3.7.Ursolik asit standardına ait kromatogram	43
Şekil 3.8.Oleanolik asite ait kalibrasyon grafiği	43
Şekil 3.9.Oleanolik asit standardına ait kromatogram	44
Şekil 3.10.Oleanolik asit ve ursolik asit standardına ait kromatogram.....	44
Şekil 4.1.Farklı çözücülerle ekstrakte edilen örneklerin triterpenik asit içeriği	46
Şekil 4.2.Analizi yapılan çayların triterpenik asit içeriğinin karşılaştırılması	50
Şekil 4.3.Farklı Sürgün döneminde siyah çayların triterpenoik asit içeriği (A, B, C: 1. sürgün dönemi; D, E,F: 2. sürgün dönemi)	55

KISALTMALAR

AETS	: Akridon-9-etil-p-toluensülfonat
ATP	: Adenozintrifosfat
CG	: Kateşin gallat
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin gallat
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin gallat
IC₅₀	: Yarı-maksimum engelleyici konsantrasyon
GCG	: Gallokateşin gallat
DMAPP	: Dimetilalil pirofosfat
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FPP	: Farnesil pirofosfat
GCMS	: Gaz kromatografi kütle spektroskopi cihazı
GC-FID	: Gaz kromatografisi alev iyonizasyon dedektörü
GPP	: Geranil pirofosfat
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPLCT	: Yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi cihazı
LC-MS	: Sıvı kromatografisi kütle spektroskopi cihazı
LD₅₀	: Ortalama öldürücü doz
TF	: Teaflavin
TLCS	: İnce tabaka kromatografisi
TGF-β	: Aktarıcı büyüme faktörü
TPA	: 12-o-teradekanoylporbol
TR	: Tearubigin
USC	: Ultrason destekli süper kritik akışkan
UV	: Ultraviole

SİYAH ÇAYIN TRİTERPENİK ASİT İÇERİĞİ

ÖZET

Terpenler doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Meyve, sebze, çiçekler ve bitkilerde doğal olarak bulunan bu maddelerin sağlık üzerine olumlu etkileri vardır. Triterpenik asitler terpenler içerisinde yer almaktadır. Bitkilerde en yaygın rastlanılan triterpenik asitlerin başında ursolik ve oleanolik asit gelmektedir. Bu çalışma siyah çayın triterpenik asit miktarını belirlemek için yapılmıştır. Bunun için ülkemizde üretilen siyah çaylarla ithal siyah çaylar analiz edilerek ithal yeşil çaylarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca, kampanya süresince triterpenik asitteki değişimi belirlemek için belli aralıklarla alınan siyah çay örneklerinde de analizler tekrar edilmiştir. Çalışmada, 19 yerli siyah çay, 19 yabancı menşeli siyah çay ve 19 yabancı menşeli yeşil çay kullanılmış, sonuçlar istatistiksel olarak incelenmiştir. Ayrıca, 1 ve 2. kampanya süresince farklı zamanlarda siyah çayların triterpenik asit içeriği de belirlenmiştir. Triterpenik asitler metil alkol kullanılarak, ultrason destekli ekstraksiyon tekniği ile özütlenmiş ve HPLC ile analiz edilmiştir. Ekstraktlarda ursolik asitin yanı sıra bazı örneklerde onun bir izomeri olan oleanolik asitin varlığı da tespit edilmiş ve sonuçlar toplam triterpenik asit olarak verilmiştir.

Yapılan çalışma sonunda 1. sürgün döneminde elde edilen siyah çayların toplam triterpenik asit miktarları %0.27-0.48, 2. sürgün döneminde % 0.01-0.37 arasında değişmiştir. Triterpenik asit varlığı 1. kampanyada yüksekken 2. kampanya döneminde önemli derecede ($p<0.05$) düşmüştür. Triterpenik asit miktarı ülkemizde üretilen siyah çaylarda % 0.38-0.67, ithal siyah çay örneklerinde % 0.04-0.26, yabancı yeşil çay örneklerinde % 0.21-0.99 arasında belirlenmiştir. Ülkemizde üretilen siyah çayların triterpenik asit içeriği yabancı menşeli siyah çaylardan önemli derecede ($p<0.05$) yüksekken yabancı menşeli yeşil çaylarla uyumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler:Çay;Ursolik Asit; Oleanolik Asit; Triterpenik Asit.

TRITERPENIC ACID CONTENT OF BLACK TEA

ABSTRACT

Terpenes are widely available in nature. These substances which naturally present in fruits, vegetables, flowers and plants are positive effects on health. Triterpenic acids located in terpenes. The most commonly encountered triterpenic acids in plants are ursolic and oleanolic acids. This study was conducted on to determine the triterpenic acid amount of black tea. For this purpose, imported black teas with black teas produced in our country were analyzed and compared with imported green teas. Also, analyzes of taken black tea samples were repeated to determine the change of triterpenic acid during the campaign period at regular intervals. In the study, 19 local black tea, 19 foreign origin black tea and 19 foreign origin green tea were used and the results were analyzed statistically. Further, triterpenic acid content of black tea were determined at different times during the first and second campaign period. With using methyl alcohol triterpenic acids were extracted by ultrasound-assisted extraction techniques and were analyzed by HPLC. In addition, in some samples as well as ursolic acid, the presence of its isomer oleanolic acid have also been identified and the results are given as total triterpenic acid.

According to our findings, the total amount of triterpenic acid content in the first and second exiles period of obtained black teas were found to range from %-0.48, % 0.01-0.13, respectively. While the presence of triterpenic acid was found higher in the first campaign period, it was found to fall significantly ($p < 0.05$) in second campaign period. Triterpenic acid content of the black tea produced in our country, in imported black tea and foreign origin green tea were determined as % 0.38-0.67, % 0.04-0.26 and % 0.21-0.99, respectively. While the triterpenic acid content of black tea produced in our country was found significantly ($p < 0.05$) higher than the foreign origin of black teas, it was found compatible with the foreign origin of green tea.

Anahtar Kelimeler: Tea; Ursolic Acid; Oleanolic Acid; Triterpenic Acids.

1.GİRİŞ

Dünya çapında insan hastalıklarını önleme ve iyileştirme amacı ile bitkisel kaynaklı doğal ürünler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunlar, içerdikleri değişik yapıda biyoaktif bileşikler ile insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Bitkilerdeki biyoaktif bileşikler genellikle ikincil metabolitler olup, birincil metabolitlerden (proteinler, lipidler, karbonhidratlar gibi) türerler ve çok düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Bitkilerde ve diğer organizmalarda bulunan besleyici olmayan bu organik bileşikler patojenler ve çevresel strese karşı koruma sağlarlar. İkincil metabolitler meyve, tohum, kök ve yapraklarda çeşitli bitkisel kısımlarda düşük konsantrasyonlarda bulunur. İkincil metabolitlerin en yaygın bulunanları; terpenler, yağ asitleri, alkaloidler ve polifenoller/ fenilpropanoidlerdir. Birinci sınıf, terpenler; kauçuk, steroidler, esansiyel yağlar, pigmentler ve hormonları; ikinci sınıf malonil-CoA'dan türetilen bileşikler ve yağ asitlerini; üçüncü sınıf alkaloidler, tıbbi ya da toksik özellikleri ile bilinen azot içeren bileşikler içermektedir. Dördüncü sınıf ise tanenler, ligninler, flavonoidler ve kumarinleri kapsayan fenolik bileşikler kapsar (Alqahtani ve diğ., 2014).

Terpenler veya bunların kimyasal modifikasyonları ile oluşan terpenoidler izopren birimlerinden oluşmuştur (Paduch ve diğ., 2007). Bunlar, hem bitki ve hem de hayvan dokularında bulunabilen geniş bir gruptur. Doğada bitki kaynaklı en az 40.000 terpenoid (izoprenoid) olduğu tahmin edilmektedir. Birçok terpenoid bitki gelişimi, olgunlaşması ve genel metabolizması için esansiyeldir (Bohlmann ve Keeling, 2008). Bitki terpenoidleri, dallı beş karbonlu izopren birimlerinin tekrarlayan füzyonu ile elde edilir. Terpenoidler molekülde bulunan izopren birimlerinin sayılarına göre hemiterpenler (C_5), monoterpenler (C_{10}), seskiterpenler (C_{15}), diterpenler (C_{20}), sesterpenler (C_{25}), triterpenler (C_{30}), tetraterpenler (C_{40}), steroidler, poliprenoller ve politerpenler olarak sınıflandırılabilir. Bitkilerde bulunan terpenoidlerin başında; uçucu yağlar (monoterpenler), gibberellinler (diterpenler), limonoidler (triterpenler), karotenoidler (tetraterpenler), steroller, sapojeninler ve steroid hormonlar (steroidler), fitoller (poliprenoller), kauçuk, gutta ve sakız (politerpenler) gelmektedir (Hounscome ve diğ., 2011).

Terpenlerin bir grubu olan pentasiklik triterpenoidler, son zamanlarda fazla ilgi çekmektedir. Pentasiklik triterpenoidler, bitkilerde yaygın olarak oluşan C₃₀ izoprenoid bileşiklerin bir sınıfıdır (Babalola ve Shode, 2013). Bugüne kadar damaran, ergostan, fridelan, lupan, tarakastan ve ursan içeren yaklaşık 20.000 triterpenoide, tıbbi bitkilerin çeşitli kısımlarında rastlanmıştır. Bunların antimikrobiyal ajan, antikanser, antienflamatuar özellikleri konusunda yaygın çalışmalar yapılmaktadır. Ursan tipi pentasiklik triterpenik asit olan ursolik asit, sikloskualenoid ailesine ait olup birçok şifalı bitkinin meyve ve yapraklarında, elma, armut, erik ve diğer meyvelerin dış kısımlarında koruyucu tabaka olarak yer almaktadır. Ursolik asit, serbest asit veya saponinlerin aglikonu şeklinde bulunabilmektedir. Son çalışmalar, enflamasyon kaynaklı kanserlerin çeşitli tiplerini içeren çeşitli insan hastalıklarında ursolik asidin yararlı etkilerini ortaya koymuştur (Shanmugam ve diğ., 2013). Başlangıçta ursolik asit inaktif terpenoid bileşik olarak kabul edilmiştir ancak düşük toksitesi ve çeşitli biyolojik işlevleri ve farmakolojik özellikleri nedeniyle üzerinde yaygın çalışma yapılmıştır. Nispeten düşük toksitesi nedeni ile hem oral hem de lokal olarak uygulanabilen ilaç formülasyonlarında yer almaktadır (Venugopal ve Liu, 2012). Oleanan tipi pentasiklik triterpenik asit olan oleanolik asit, ursolik asidin bir izomeridir. Bu asit, ökse otu, Ginseng kökleri, şeker pancarı, zeytin yapraklarında serbest halde ve yaygın olarak saponin aglikonu şeklinde bulunur (Breitmaier, 2006). Ursolik ve oleanolik asitin suda çözünürlükleri sınırlıdır. Kimyasal olarak modifiye türevleri ve suda çözünürlüklerini artırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çözünürlüğünü artırmak için nanosüspansiyonların kullanımı ve hidrofilik siklodekstrinler ile kovalent olmayan kompleks oluşturma üzerinde çalışılmaktadır (Liu, 2005). Günümüze kadar çeşitli bitkilerin pentasiklik triterpenoidlerin varlığı ve sağlık üzerine etkileri ortaya konulmuştur. Çalışmanın hareket noktası Ülkemizde bu konudaki çalışmaların azlığıdır.

1.1. Tezin Amacı

Bu tez çalışması ile güncel bir öneme sahip olan ursolik ve oleanolik asit bileşiklerinin yerli ve yabancı menşeli çay örneklerinde mevcudiyetlerini araştırarak literatüre kazandırmak hedeflenmiştir. Özellikle çağımızın korkulan hastalığı olan kanser ile ilgili sağlık üzerinde çok sayıda faydası bulunan pentasiklik terpenoid bileşiklerin yaygın tükettiğimiz çaylarda da bulunup bulunmadığını saptamak için bu çalışma planlanmıştır. Ayrıca, ülkemizde üretilen

siyah çayların triterpenik asit içeriğinin sürgün dönemine göre değişip değişmediğini belirlemek de amaçlar arasındadır.

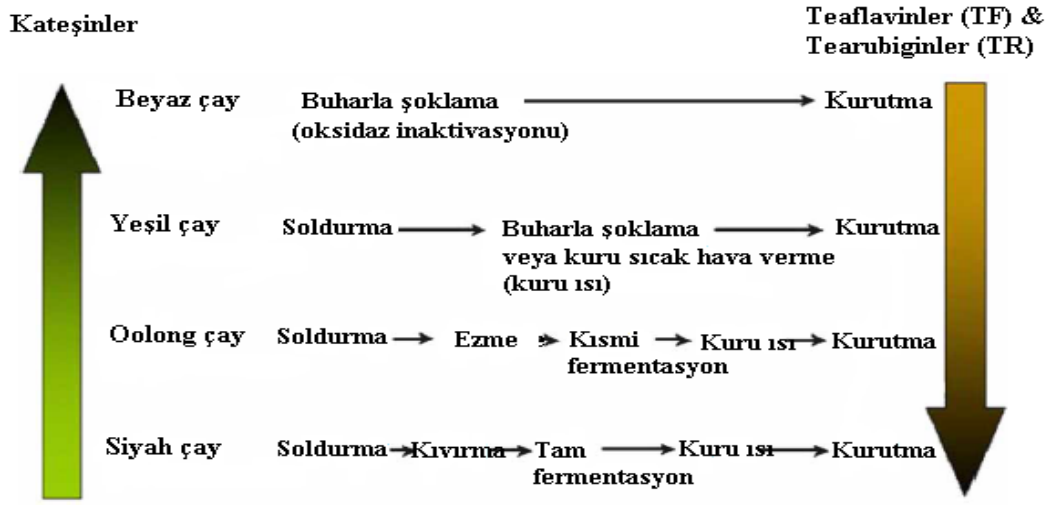


2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Çay Bitkisi ve Özellikleri

Dünyada sudan sonra en yaygın tüketilen içecek olan çayın tarihçesi çok eski yıllara dayanmaktadır. Çayın Erken Paleolitik dönemde (yaklaşık 5000 yıl önce) ilk kez tüketildiği arkeolojik kanıtlarda mevcuttur (Cooper, 2012). Birçok efsaneye konu olan çay bitkisi, her ülkenin kültüründe farklı bir yere sahiptir. Bu bitki, angiosperma çiçek açanlar sınıfından ve *Camellia* familyasındandır. Bitkinin latince ismi *Camellia sinensis*'tir. Morfolojik özelliklerine göre Çin çayı (*Camellia thea sinensis*), Assam çayı (*Camellia thea assamica*) ve Kamboçya çayı (*Camellia thea cambodiensis*) olmak üzere 3 türe ayrılmaktadır (Kacar, 2010).

Siyah, yeşil, oolong, beyaz gibi çay çeşitlerinin tümü *Camellia sinensis* bitkisinden farklı tekniklerle üretilmektedir. Siyah çay üretilirken fermentasyon uygulanır. Taze çay yaprakları soldurulur, kıvrılır ve doğal oksidasyona terkedilir. Fermentasyon sırasında siyah çaya daha güçlü ve buruk tat veren yüksek molekül ağırlıklı kondense polifenoller oluşur. Oolong çay olarak bilinen Asya'nın bazı bölgelerinde popüler olan çay tipi daha az fermentasyona uğradığından siyah çaya göre daha hafif aromaya sahiptir (Şekil 2.1) (Cooper, 2012).



Şekil 2.1. Farklı çayların üretim aşamaları (Cooper, 2012).

Çay bitkisinin bileşimi; iklim, mevsim, çay türü, yaprağın yaşına bağlı olarak değişmektedir. Çay bitkisi, kateşinler ve gallik asiti içine alan fenolik bileşikler fazla miktarda içerir. Çay bitkisinde bulunan diğer bileşenler; alkaloidler, proteinler, lipitler, aminoasitler, steroller, vitaminler, mineraller, lezzet ve aroma bileşenleri, triterpenoidler ve diğerleridir (Perva-Uzunalic ve diğ., 2006). Çay bitkisi sudan sonra en fazla polifenollerini içermektedir. Taze sürgünler kuru maddede ortalama olarak % 36 polifenol, %15 protein, % 4 aminoasit, %25 karbonhidrat, % 6.5 lignin, %5 kül, %2 lipid, %1.5 organik asit, % 0.5 klorofil ve % 0.1'den az karotenoidler ve uçucu bileşikler gibi maddeleri içermektedir (Çizelge 2.1).

Polifenoller en fazla kateşinleri kapsar. Kateşinlerden epigallokateşin gallat (EGCG), epigallokateşin (EGC), epikateşin gallat (ECG) ve epikateşin (EC) miktar olarak çok, gallokteşin, epigallokteşin digallat, 3-metil epikateşin gallat, kateşin gallat (CG) ve gallokteşin gallat (GCG) ise daha az miktarda yer almaktadır (Koca ve Bostancı, 2014). Yeşil çay üretimi sırasında fenolik bileşikler korunurken siyah ve oolong çaya işleme sırasında değişime uğrar (Çizelge 2.2).

Günümüze kadar çayın bileşimi konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu çay fenollerini üzerinde yoğunlaşmıştır. Oysa taze çay yaprakları, seskiterpenler, oksijenlenmiş terpenler de içermektedir (Senanayake, 2015).

Çizelge2.1. Çay yaprağındaki ana bileşenlerin kompozisyonu (Vuong ve diğ., 2010).

Bileşenler	% Kuru Ağırlık
Polifenoller	36
Kafein	3
Teanin	1.5
Protein	15
Lignin	6.5
Karbonhidratlar	25
Klorofil	0.5
Organik asitler	1.5

Çizelge 2.2. Yeşil ve siyah çay yaprağının ortalama kompozisyonu (% kuru ağırlık) (Cabrera ve diğ., 2006).

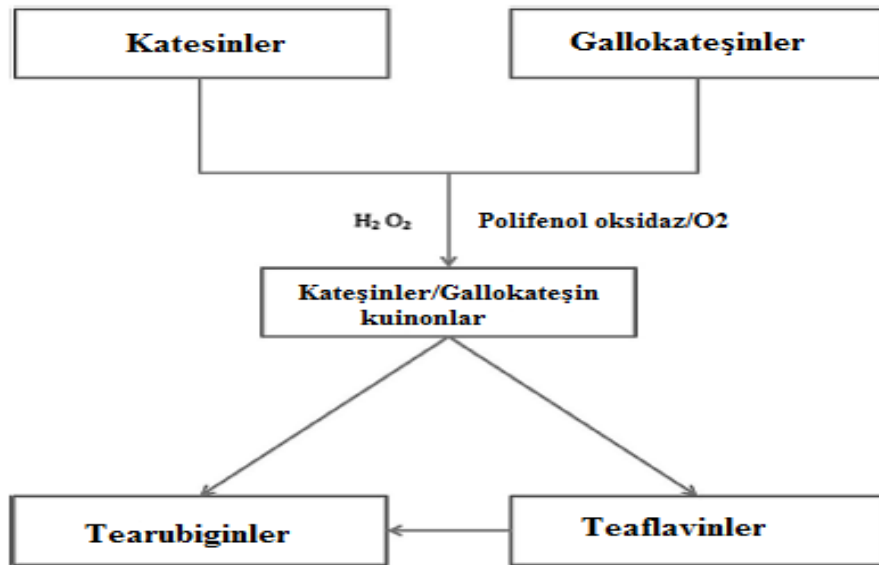
Bileşen	Yeşil çay	Siyah çay
Proteinler	15	15
Aminoasitler	4	4
Lif	26	26
Diğer karbonhidratlar	7	7
Lipidler	7	7
Pigmentler	2	2
Mineraller	5	5
Fenolik bileşikler (genellikle flavonoidler)	30	5
Okside olmuş fenolik bileşikler (özellikle teafavinler ve tearubiginler)	0	25

2.1.1. Siyah çay ve özellikleri

Siyah çay, çay bitkisinin soldurma, kıvrırma, fermentasyon ve kurutma aşamaları sonucunda üretilmektedir. Üretimdeki ilk aşama olan soldurma ile taze yaprakların orijinal nem içeriği olan % 75-80'ler, % 50-60'a düşürülür. Bu işlem yaklaşık 30 °C'de 10-12 saat sürer. İkinci aşama olan kıvrırmada yaprak hücreleri parçalanarak, polifenollerin oksidasyonunda rol alan polifenol oksidaz hücre dışına çıkarılır. Enzimatik oksidasyon aşamasında ise polifenol oksidaz katalizörlüğüyle fenolik bileşikler oksitlenir. Son aşamada yapraklar yaklaşık 60 dakika süreyle sıcak hava akımına (% 90-100) maruz bırakılır. Son ürün sınıflandırılır, paketlenir ve depolanır (Murugan ve Al-Sohaibani, 2013). Siyah çay üretiminde yaygın olarak kullanılan 2 yöntem vardır. Bunlar: Ortodoks ve CTC (crush, tear, curl)'dir. Ortodoks

teknğinde; soldurulmuş çay yaprakları kıvrılırken, CTC yönteminde ezme, parçalama ve kıvrırma tekniği uygulanır. Bu temel farklılık dışında soldurma, enzimatik oksidasyon, kurutma ve sınıflandırma her iki yöntemde de ortaktır (Kumar ve diğ., 2013).

Yeşil çay bitkisinde bulunan kateşinler ısı, asit ve enzimle oksidasyona karşı hassastır. Siyah çay üretiminde, fermentasyonda iki ana enzim polifenol oksidaz ve peroksidaz etkilidir. Polifenol oksidaz, flavanollerin teafavinlere (TF) ve tearubiginlere (TR) oksidasyonunda anahtar rol oynar. Hidrojen peroksit gibi peroksit kullanarak o-difenollerin onların kinonlarına oksitlenmesini katalizleyebilen peroksidazlar belirli flavanoller üzerinde etkilidir (Sang ve diğ., 2011). Fermentasyon sırasında çay yapraklarının monomerik kateşinleri polifenol oksidazın etkisine maruz kalır. Bu enzimin aktivitesiyle kateşinler kuinonlara, bisflavanlara ve daha kompleks yapıları TF, TR ve yüksek molekül ağırlıklı komplekslere okside olur (Şekil 2.2). Fermentasyon sonucu, flavanol içeriği azalır. Çay fermentasyonunun derecesi % 0-85 (% 0-yeşil, % 85-siyah) olarak kabul edilmektedir. Fermentasyon sürecinde kateşin (EGCG, EGC, EC, C ve GCG) seviyesinin kademeli (yavaş yavaş) olarak düştüğü, bununla birlikte gallik asit seviyesinin yükseldiği bildirilmektedir. Kafein miktarı siyah çay üretimi esnasında yükselmektedir. Fermente olmuş çay yapraklarında oksidatif enzimlerin aktivitesi taninler (tanen) ve kateşinlerin kahve-siyah ürünlere dönüşümüne yol açar (Gramza ve diğ., 2005).



Şekil2.2.Kateşinlerden teaflavin ve tearubiginin oluşumu (Gadkari ve Balaraman, 2015).

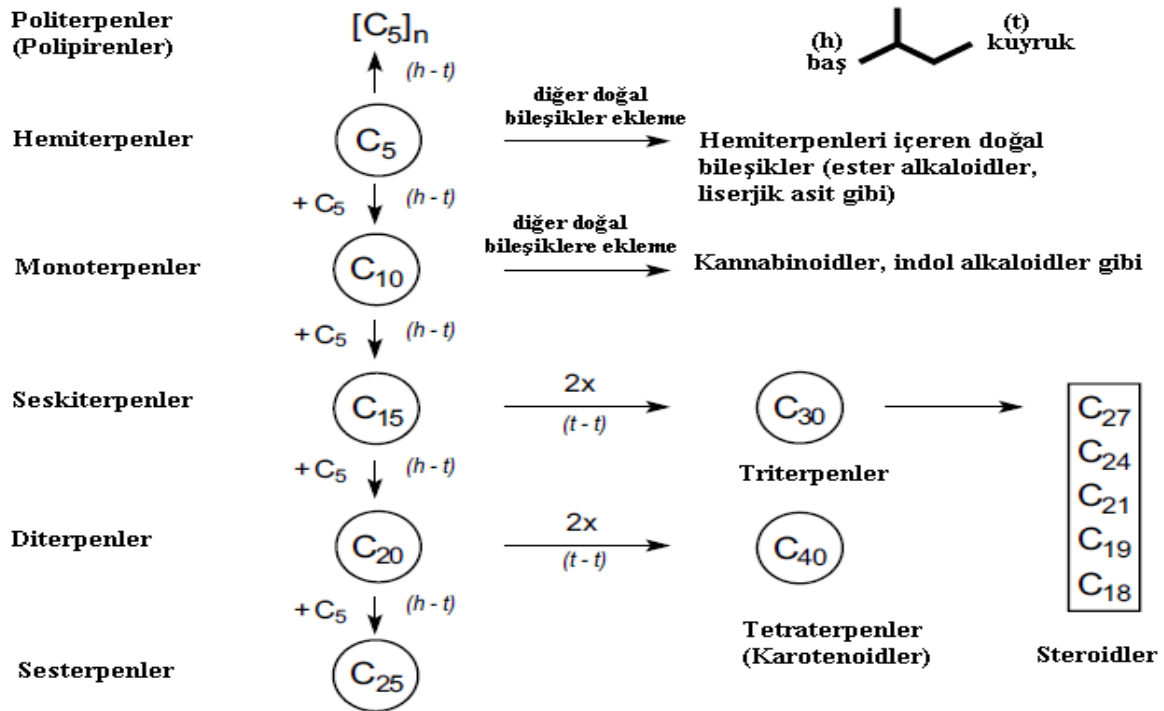
2.2 Terpenler ve Genel Özellikleri

Bitkiler ve hayvanlar tarafından şaşılabacak derecede farklı kimyasallar üretilir. Bunların çoğu karbon temellidir ve karbon kimyası olarak bilinen organik kimya yaşayan organizmaların kimyasıdır. Bitki ve hayvanların bu kimyasal ürünleri birincil ve ikincil metabolitler olarak sınıflandırılabilir. Bütün türlerde ortak olan birincil metabolitler; proteinler, karbohidratlar, lipidler ve nükleik asit alt gruplarına ayrılabilirler. Materyallerin bu dört grubu, üyelerinin kimyasal yapılarına göre tanımlanır. İkincil metabolitler ise terpenoidler, alkaloidler, şikimatlar ve poliketidler alt gruplarına ayrılabilirler (Sell, 2003).

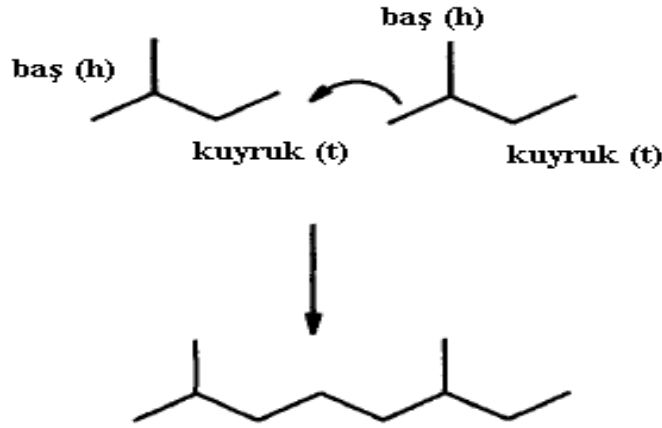
Terpen, terebentinde (*Balsamum terebinthinae*) bulunmuştur ve terpen jenerik adı başlangıçta hidrokarbonlara uygulanmıştır. Sonundaki -en eki olefinik bağların varlığını göstermektedir (Sell, 2003). Başlangıçta terpenler olarak anılan terebentin reçine asitleri ve bazı hidrokarbonları içerir. Sözde çam ağacı reçinesi olan terebentin viskoz hoş kokulu bir balsamdır (Breitmaier, 2006). Terpenler, izopren (2-metilbüt-1,3-dien) birimlerinden türemiştir (Paduch ve diğ., 2007). Turunçgiller, kişniş, okaliptüs, lavanta, limon, çim, zambak, karanfil, kimyon, nane türleri, güller, biberiye, adaçayı, kekik, menekşe ve diğer bitki veya onların kısımları (kök, rizom, yaprak, çiçek, meyve, tohum) hoş kokuları, tatları ve belirli farmakolojik aktiviteleri ile bilinirler. Bu özelliklerin önemli kısmı terpenler nedeniyle (Breitmaier, 2006). Bazen terpen kelimesi herhangi bir terpenoidi belirtmek için de kullanılır (Sell, 2003). Yapıya oksijen dahil olması olduğu gibi modifiye edilmiş bir terpeni belirtirken terpenoid denilir (Zwenger ve Basu, 2008). Benzer şekilde izoprenoid sık sık terpenoid yerine kullanılır (Sell, 2003; Ikeda ve diğ., 2008; Jain ve Ramawat, 2013). Tüm terpenlerin temel formülü $(C_5H_8)_n$ olup, n izopren ünitlerinin sayısını göstermektedir. İzopren ünitleri baş-kuyruk bağıyla doğrusal (lineer) zincirle veya halka oluşturacak şekilde bağlanmaktadır. Tetrasiklik triterpenlerin ve steroidlerin biyogenetik kökenleri Şekil 2.3'te özetlenmiştir. 2-metilbütanın izopropil parçası baş (h), etil kalıntısı kuyruk (t) olarak adlandırılır (Breitmaier, 2006). Mono, seski, di ve sesterpenler baştan kuyruğa bağlı izopren birimleri içerirken triterpenler ve karotenoidler (tetraterpenler) baştan başa bağlı sırası ile C_{15} ve C_{20} birimlerini içerir. Birçok terpen hidrokarbonlardır fakat alkoller, aldehitler veya ketonlar gibi oksijen içeren bileşikler de terpenlerin sınıfları içinde yer alır (Brahmkshatriya ve Brahmkshatriya, 2013).

Prensipte iki izopren birimi baş-baş, kuyruk-kuyruk veya baş-kuyruk şeklinde bağlanabilir. Yaygın olan füzyon baş-kuyruk birleşmesidir. Monoterpenoid iskeletini

oluşturan baş-kuyruk birleşimi ile oluşan iki izopren birimi Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Steroidler ve karotenoidlerde sıklıkla kuyruk-kuyruk çifti oluşmaktadır ve bu durum bunların karakteristik özelliğidir. Bunlarda iskeletin merkezinde kuyruk-kuyruk füzyonu vardır. Varsayımsal baş-baş'a füzyon oluşmamaktadır. Temel C_{5n} iskeleti oluştuktan sonra zincir halka oluşturmak için katlanabilir veya oksijen ya da başka hetero atom sokulmasıyla işlevselleştirilebilir (Sell, 2003).



Şekil 2.3. İzopren yapısı ve baş-kuyruk bağlanma şekilleri (Breitmaier, 2006).



Şekil 2.4. Monoterpen omurgasını üretmek için iki izopren biriminin baş-kuyruk birleşiminin şematik gösterimi (Sell, 2003).

Terpenler içerdikleri C_5 birimlerinin sayısına göre sınıflandırılır (Çizelge 2.3). Örneğin, 10 karbonlu terpenler iki adet C_5 birimi içerir ve monotermenler olarak adlandırılır. 15 karbonlu terpenler (üç adet C_5 birimi) seskiterpenler ve 20 karbonlu terpenler (dört adet C_5) diterpenlerdir. Daha büyük terpenler triterpenler (30 C), tetraterpenler (40 C) ve politerpenoidlerdir ($[C_5]_n$ karbon atomu, $n>8$) (Taiz ve diğ., 2015).

Çizelge 2.3. Terpenlerin sınıflandırılması (Brahmkshatriya ve Brahmkshatriya) 2013).

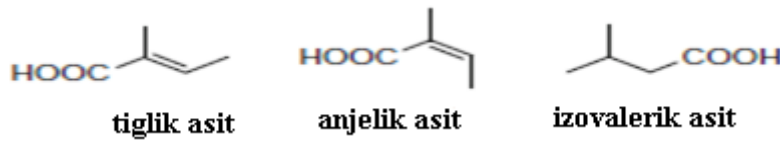
Terpenler	İzopren Birimleri	Karbon Atomları
Hemiterpenler	1	5
Monoterpenler	2	10
Seskiterpenler	3	15
Diterpenler	4	20
Sesterpenler	5	25
Triterpenler	6	30
Karotenoidler	8	40
Kauçuk	>100	>500

Bugüne kadar terpen grubu içinde yaklaşık 30 bin üzerinde bileşik tanımlanmıştır. Geçtiğimiz 10 yıl içinde şimdiye dek 4 binden farklı tespit edilen bileşikler (serbest triterpenoidler, triterpenik glikozitler (saponinler), fitosteroller ve/veya onların öncüleri) çeşitli biyolojik etkileri nedeni ile ön plana çıkan siklik triterpenoid benzeri bileşiklerin geniş bir grubudur. Bundan başka, hormonal etkileri olmayan ancak yapısal olarak kolesterol ve steroid hormonları ile ilgili bitki steroid saponinlerinin başka bir grubu daha vardır. Biyolojik

açından bakıldığında, en önemli triterpenoid yapıları oleanan, ursan, lupan ve damaran-euphane triterpenoidleridir. Triterpenoidlerin antienflamatuar, karaciğeri koruyucu, analjezik, antimikrobiyal, antimikotik, virostatik, bağışıklık sistemini düzenleyici ve tonik etkileri bildirilmiştir. Hepatit, parazit, protozoal enfeksiyonların tedavisinde ve önlenmesinde ve her şeyden önce sitostatik etkileri için kullanılır. Kullanılan triterpenoidlerin dezavantajı aslına bakılırsa hemolitik ve sitostatik özellikleri ile ilişkili toksisitedir (Dzubak ve diğ., 2006).

2.2.1. Hemiterpenler (2-metilbütan)

Beş karbon izopren ünitesi (=2-metilbütadien) içeren hemiterpenler, terpenoidlerin en basit tipidir. Oluşumları seyrek ve biyolojik olarak önemli değildir. İzopentenil pirofosfat hemiterpenlerin öncü maddesi olarak kabul edilebilir (Chizzola, 2013; Sharma ve diğ., 2013). Bilinen hemiterpen sayısı 100'den azdır. Tiglik, anjelik ve izovalerik asitler (Şekil 2.5) bitkilerde bulunan, doğal oluşan hemiterpenlerin en bilinen örnekleridir (Zhang ve diğ., 2016).

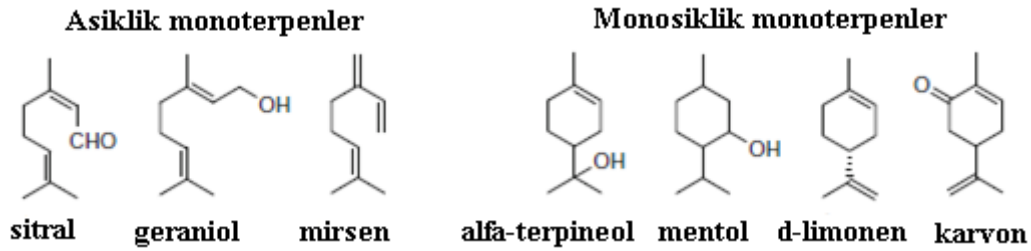


Şekil 2.5. Hemiterpenlerin bazı temsilcileri (Zhang ve diğ., 2016).

2.2.2. Monoterpenler (2,6-dimetiloktan)

Monoterpenler, renksiz, lipofilik ve uçucu bileşiklerdir. Bunlar, çoğunlukla birçok bitki türünde uçucu yağların bileşeni olarak bulunur ve çiçeklere karakteristik kokularını, meyvelere karakteristik tatlarını verir. Ayrıca herbisit, böcek ilaçları, antimikrobiyal maddeler ve diyet antikarsinojenleri olarak da önem taşırlar. Çeşitli biyolojik özellikleri nedeni ile monoterpenler kapsamlı endüstriyel uygulamalarda ve gıda, kozmetik, topikal ilaçlar, parfüm, böcek ilacı gibi alanlarda ve ürünlerde aroma maddeleri olarak kullanılırlar (Bonfill ve diğ., 2013). Yaklaşık 1.500 monoterpen bildirilmiştir. Bunların çoğu kafadan kuyruğa bir şekilde bağlantılıdır ve 2,6-dimetiloktan'dan türetilir (Breitmaier, 2006). Monoterpenler (Şekil 2.6) iki izopren (=2-metilbütadien) biriminden oluşur (Chizzola, 2013). Farklı kanserlerin

önlenmesi ve tedavisinde faydaları olduğu bildirilmektedir. Monosiklik monoterpenler, D-limonen ve peril alkolün doza bağlı bir şekilde, karaciğer, deri, meme, kolon, akciğer, prostat, mide ve pankreas karsinomalarının gelişimini inhibe ettiği kaydetilmiştir. Karveol, uroterpenol ve sobrerol gibi monoterpenler, insan meme karsinomlarına karşı aktivite göstermiştir (Brahmkshatriya ve Brahmkshatriya, 2013).



Şekil 2.6.Bazı monoterpenlerin kimyasal yapıları (Brahmkshatriya ve Brahmkshatriya, 2013).

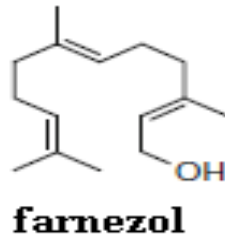


Şekil 2.7. Peril alkol, karveol, sobrerol ve uroterpenolün kimyasal yapısı (Brahmkshatriya ve Brahmkshatriya, 2013).

2.2.3. Seskiterpenler (2,6,10-trimetildodekan=farnesen)

6.500'den fazla tanımlanan bileşiklere sahip seskiterpenler terpenoidlerin en büyük ve en çeşitli sınıflarıdır. Seskiterpenlerin çoğu uçucu sıvılardır ve sık sık monoterpenlerle birlikte bitki esansiyel yağlarını içerir. Moleküler yapıları asiklik olabilir veya monoterpenler gibi halkalar içerebilir (Holopainen ve diğ., 2013). Farnesanlar, monosiklik farnesan seskiterpenler (siklofarnesanlar, bizabolanslar, germakranlar, elemanlar, humulanlar), polisiklik farnesan seskiterpenler (karyofilanlar, ödesmanlar, furanödasmanlar, eremofilanlar, furanoeremofilanlar, valeranlar, kadinanlar, drimanlar, vb.) ve diğer polisiklik seskiterpenler seskiterpenler sınıfında yer alan bileşiklerdir (Breitmaier, 2006). Seskiterpenoidlerin antienflamatuvar, anti-HIV, antibakteriyel ve antitümör aktivite gibi biyolojik aktiviteleri

vardır. Farnezol (Şekil 2.8) ve nerolidolün (hidrofilik seskiterpen) *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerinin antibiyotiklere duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir. Bakteriyel hücre membranının normal bariyer fonksiyonunu bozarak antibiyotikler gibi eksojen çözünenlerin hücreye nüfuz etmesini sağlarlar (Fernandez-Marin ve diğ., 2013).



Şekil 2.8. Seskiterpenler sınıfında yer alan farnezolün kimyasal yapısı (Fernandez-Marin ve diğ., 2013).

2.2.4. Diterpenler (2,6,10,14-tetrametilhekzadekan=fitan)

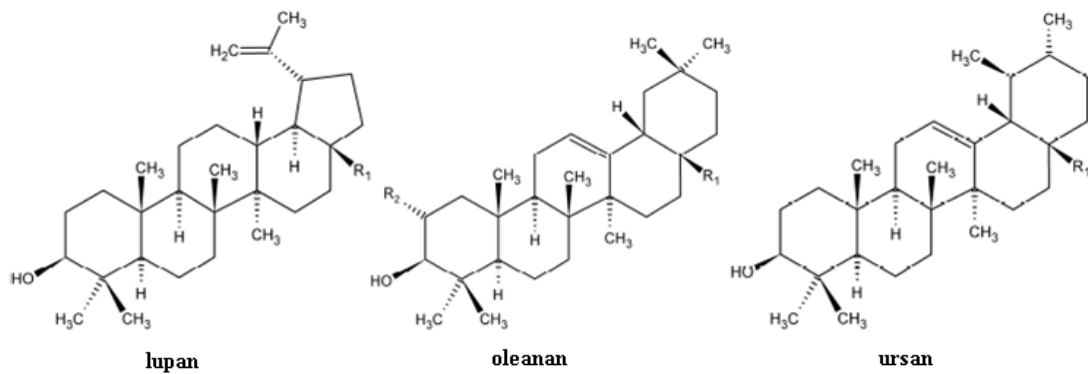
Biyolojik ve farmakolojik özellikleri nedeni ile diterpenler ilgi çekmektedir. Doğada, kara ve deniz organizmalarında binlerce diterpen bileşiği tanımlanmasına rağmen bunlardan birkaçı klinik olarak etkili bulunmuştur. Genel olarak, sentetik, suda çözünür, benzer taksoterleri ile antikanser ilaç taksol yumurtalık, meme ve akciğer kanserine karşı tedavide kullanılırlar. Ginkgolidler olan diterpenler şok, yanıklar, ülser, enflamasyon ve cilt hastalıkları durumunda trombosit aktive edici faktör artışına karşı güçlü ve seçici antagonistik etki gösterirler. Diterpenler; doğrusal (lineer), bisiklik, trisiklik veya tetrasiklik, pentasiklik ve makrosiklik diterpenler olarak iskelet çekirdeklerine göre sınıflandırılabilir (Lanzotti, 2013). Basit diterpenler çoğunlukla uçucu olmayan bileşiklerdir ve bitki reçinelerinde bulunurlar (Holopainen ve diğ., 2013). Doğada genellikle küçük ölçekli bir alifatik ya da aromatik asitler ile esterleşmiş keton ve hidroksil gruplara sahip poli oksijenli formda yaygın olarak bulunurlar (Lanzotti, 2013). Fitانlar, siklofitانlar, bisiklofitانlar (labdanlar, yeniden düzenlenmiş labdanlar), trisiklofitانlar (pimaranlar, izopimaranlar vb) ve tetrasiklofitانlar (gibberellinler, grayanotoksinler), sembranlar ve siklosembranlar (dolastanlar, dolabellanlar, briaranlar vb), pirenilseskiterpenler (zenikanlar, zeniafilanlar, pireniledesmanlar, bifloranlar, pirenildrimanlar vb) ve ginkolidler diterpenler sınıfında yer alan bileşiklerdir (Breitmaier, 2006).

2.2.5. Sesterpenler (2,6,10,14,18-pentametilikoza)

150'den fazla sesterpen bugüne kadar bilinmektedir. Sesterpenler nadiren yüksek bitkilerde meydana gelir. Asiklik sesterpenler, monosiklik sesterpenler, polisiklik sesterpenler (bisiklik sesterpenler, trisiklik sesterpenler, tetra ve pentasiklik sesterpenler sesterpenler sınıfında yer alan bileşiklerdir (Breitmaier, 2006).

2.2.6. Triterpenler (2,6,10,15,19,23-hekzametiltrakoza=skualen)

Özellikle bitkilerde ve bütün organizmalarda bulunan triterpenler doğal ürünlerin bir sınıfıdır. Triterpen asitler, anti-enflamatuar, antimikrobiyal, antiviral, sitotoksik ve kardiyovasküler etkileri içeren eşsiz ve önemli biyolojik ve farmakolojik özellikteki maddelerdir (Silva ve diğ., 2012). Lineer triterpenler, tetrasiklik triterpenler gonan tipi (protostanlar, fusidanlar, damaranlar, lanostanlar, sikloartanlar, kukurbitanlar vb.), pentasiklik triterpenler bakaran tipi (Şekil 2.9) (lupanlar, oleananlar, ursanlar vb.), pentasiklik triterpenler hopan tipi (hopanlar, neohopanlar, farnanlar, filkanlar, vb.), diğer pentasiklik triterpenler (stiktanlar, arborinanlar, serratanlar), iridallar triterpenler sınıfında yer alan bileşiklerdir (Breitmaier, 2006). Limonoidler (tetranortriterpenler), *Rutaceae* (turunçgil meyveler vb.) ve *Meliaceae* ailesine ait bitkilerde bulunur. Bunlar kemoterapötik aktiviteye sahiptir ve akciğer dokusunu koruma özellikleri vardır (Jain ve Ramawat, 2013).



Şekil 2.9. Lupan, oleanan ve ursan triterpenlerinin moleküler yapıları (Jäger ve diğ., 2009).

Kimyasal olarak lupanlar (Çizelge 2.4) ve hopanlar bazen steroidtriterpenler olarak ifade edilmektedir (Patocka, 2003).

Çizelge 2.4. Bazı triterpenlerin karakterizasyonu (Jäger ve diğ., 2009).

Triterpen Ailesi	Triterpen	R1	R2	M (g/mL)
lupan	lupeol	CH ₃		426.70
	betulin	CH ₂ OH		442.72
	betulinik asit	COOH		456.71
oleanan	β-amirin	CH ₃	H	426.70
	eritrodiol	CH ₂ OH	H	442.72
	oleanolik asit	COOH	H	456.71
	maslinik asit	COOH	OH	472.70
ursan	α-amirin	CH ₃		426.70
	uvaol	CH ₂ OH		442.72
	ursolik asit	COOH		456.71

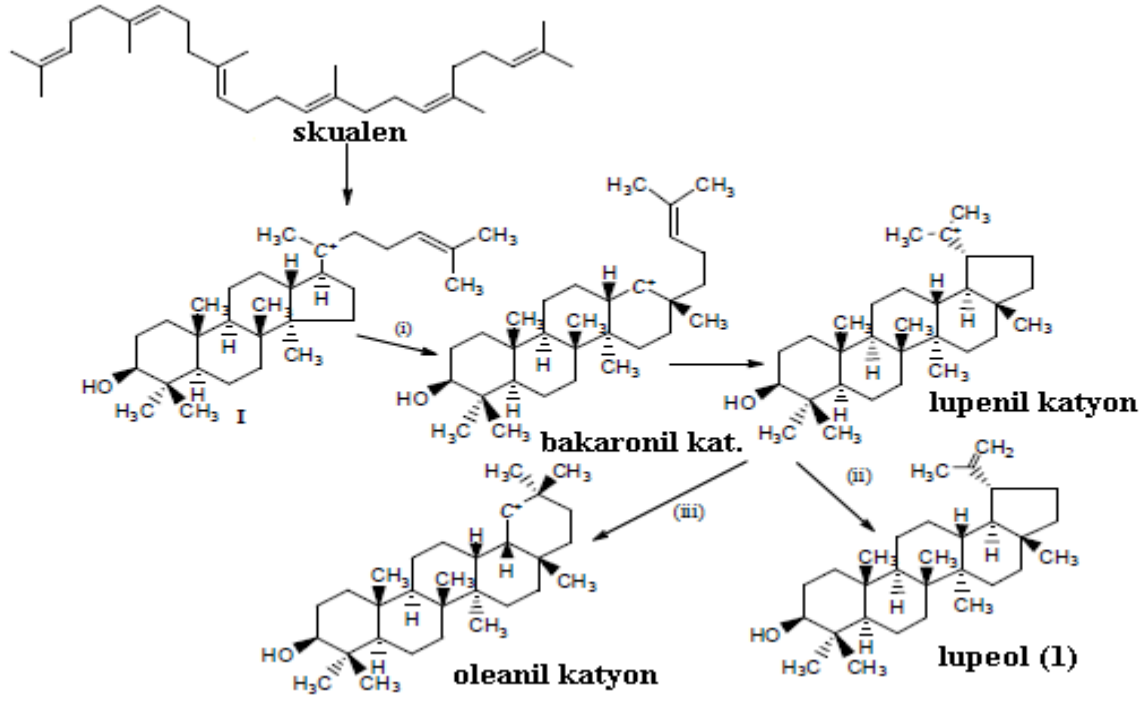
Triterpenler büyük ölçüde sebze yağları, vejetaryen yiyecekler, şifalı otlar, tahıllar ve meyvelerden elde edilirler. İnsan diyetinin doğal bileşenleri olarak kabul edilen triterpenlerin gelişmiş ülkelerde insan tüketiminin yaklaşık olarak günde 250 mg olduğu tahmin edilmektedir. Ağırlıklı olarak zeytinyağı diyetine dayanan Akdeniz ülkelerinde ortalama triterpen tüketimi kişi başı günde 400 mg/kg'a ulaşabilmektedir (Babalola ve Shode, 2013).

Triterpen glikozitler saponinler olarak bilinir. Yapısal olarak saponinler kendisine bağlı bir triterpen veya sapojenin denen steroidaglikon ve bir veya daha fazla şeker içerirler. Saponinler, doğal olarak aktif bileşiklerin bir grubudur, yaygın biçimde bitkiler aleminde oluşur ve deniz kökenli ve karasal endofitik mantarları içeren 100'ün üzerinde familyanın aktif bileşenleridir. Triterpenoidsaponinler, dikotiledonlarda bulunurken steroidalsaponinler özellikle monokotiledonlar da bulunurlar. Yapılarında yer alan hidrofilik şeker zincir (leri) ve hidrofobikaglikona bağlı olarak saponinler emülsiyon yapma, köpük oluşturma ve deterjan özelliklerine sahiptir. Aglikona bağlı şeker zinciri sayısına göre saponinler mono, di ve tridesmosidik olarak kategorize edilir (Netala ve diğ., 2015). İki grup saponin vardır; biri steroidaglikon içerirken diğeri triterpenoidaglikon içerir. Hem steroid hem de triterpenoid sistemlerin biyosentezi için skualen ortak ön madde olarak kabul edilir. Steroidler gibi

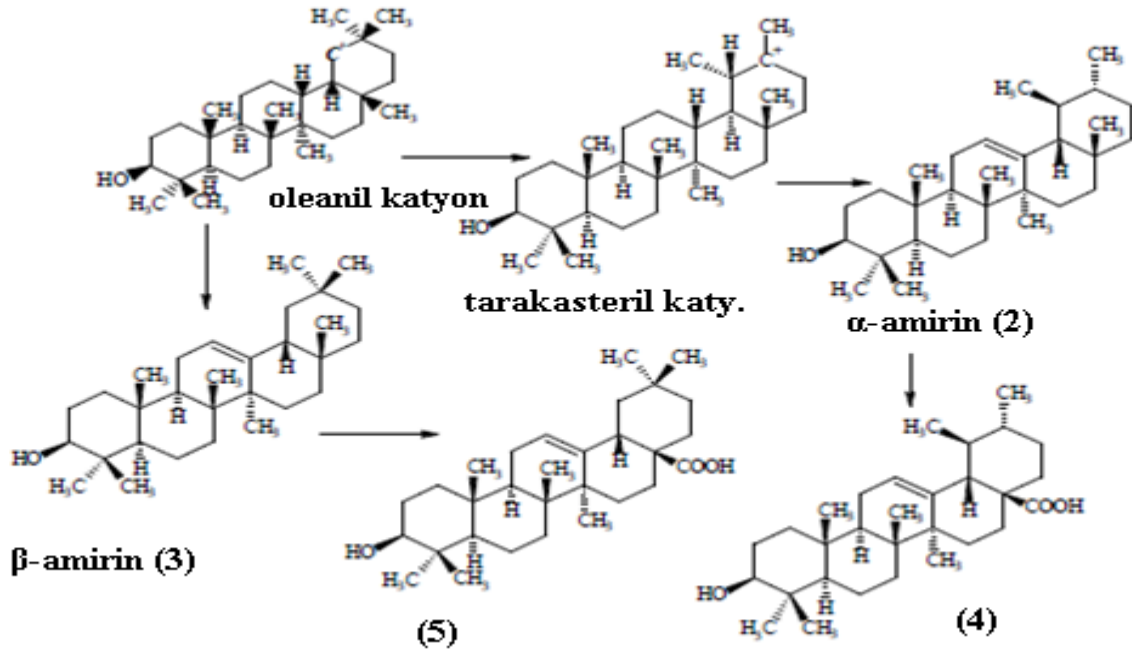
triterpenoidler de birçok biyolojik etkiye sahiptir ve triterpenoidlere olan ilgi artmaktadır (Liu, 1995).

2.2.6.1. Pentasiklik triterpenler

İkincil metabolitler, bitkiler ve onların çevresi arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesinde, ekolojik bir role sahip doğal ürünlerdir. Doğal ürünlerin önde gelen bir grubu da terpenler ve bunların türevleridir. Terpenlerin bir grubu olan pentasiklik triterpenoidler (PST), son zamanlarda çok fazla ilgi çekmektedir. PST, bitkilerde yaygın olarak oluşan C₃₀ izoprenoid bileşiklerin bir sınıfıdır (Babalola ve Shode, 2013). Pentasiklik triterpenlerden betulin (betulinol), doğada en bol bulunan bileşiktir (Patocka, 2003). Büyük sterollerden gelen halka yapısı ve biraz daha farklı bir stereokimyası olan bu bileşikler, damarenil halka sistemine (I) (Şekil 2.10) yol açan skualenin siklizasyonu ve katlanmasıyla biyosentetik olarak üretilmektedir. Biyosentetik olarak damarenil (I), lupeol (1), α -amirin (2) ve β -amirinde (3) (Şekil 2.11) bulunan karakteristik 5. halkayı oluşturmak için ilave siklizasyon ve halka genişlemesine uğrar. Ursolik asit (4), α -amirin iskeleti içerir ve bunun C₃₀ izomeri β -amirin, oleanolik asitte (5) bulunur. UA (4), triterpen saponinlerin bir aglikonu veya bir serbest asit biçiminde çeşitli bitkilerde bulunur. Kimyasal olarak UA (4), merotain olarak bilinir. Ayrıca kaynağına bağlı olarak beyaz, açık yeşil, sarı ve bazen de kremi sarı renkte oluşan urson, prunol, mikromerol ve malol olarak da bilinir (Babalola ve Shode, 2013).



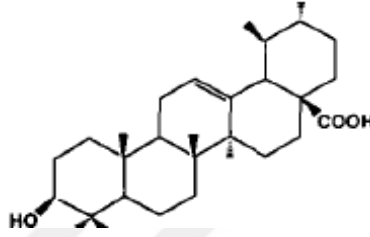
Şekil 2.10. Lupeol (1), lupenil katyon, oleanil katyon ve damarenil katyonunun (I) biyosentezi (Babalola ve Shode, 2013).



Şekil 2.11. Oleanil katyonundan ursolik asit (4) ve oleanolik asidin (5) biyosentezi (Babalola ve Shode, 2013).

2.2.6.1.1. Ursolik asit ve genel özellikleri

Ursolik asit (3-β-hidroksiüre-12-en-28-oik asit), bir pentasiklik triterpen ve bir fitosteroldür. Kimyasal formülü $C_{30}H_{48}O_3$ (Şekil 2.12) olan ursolik asidin erime noktası 283-285 °C'dir. Ursolik asidin yapısından 456.7 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. UV spektrumu; 474, 442 ve 422 nm dalga boyunda ve IR (ATR, cm^{-1}) spektrumu; 3562 (OH alkol), 2937 (OH asit), 2865 (C=C) ve 1698 (C=O)'de güçlü absorbands gösterir (Babalola ve Shode, 2013). Ursolik asit, ilk olarak turna yemişi ve meyve suyuna işleme sırasında açığa çıkan atıklarında tespit edilmiştir. Elma kabuklarında, yaban mersini ve birçok meyvenin mum tabakalarında bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle ursolik asit miktarını kullanılan işleme yöntemleri ve meyve kabuğu varlığı etkiler. Lavanta, kekik, kuru erik gibi gıda ürünleri, şifalı otlar ve bitkiler de ursolik asit içeren doğal ürünlerdir (Venugopal ve Liu, 2012).



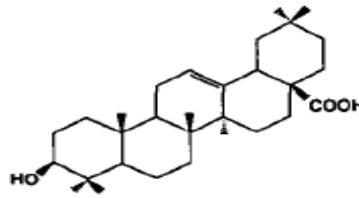
Şekil 2.12. Ursolik asidin yapısı (Liu, 1995).

Başlangıçta ursolik asit biyolojik olarak inaktif terpenoid bileşik olarak kabul edilmiştir, ancak düşük toksitesi ve çeşitli biyolojik işlevleri ile birlikte farmakolojik etkilerine bağlı olarak ursolik asidin daha başka yararlı özelliklerini belirlemek için çalışmalar yapılmaktadır. Akut toksite açısından LD_{50} değeri ağızdan ilaç alımında 8330 mg/kg ve farede periton boşluğuna (karın zarına) uygulamada 637 mg/kg'dır (Venugopal ve Liu, 2012).

2.2.6.1.2. Oleanolik asit ve genel özellikleri

Oleanolik asit, ökse (*Viscum album*, *Viscaceae*), Ginseng kökleri, şeker pancarı, zeytin ağacı yapraklarında serbest halde bulunurken yaygın olarak saponin aglikonu şeklinde bulunur (Breitmaier, 2006). Doğal ürün oleanolik asit (3β-hidroksiolean-12-en-28-oik asit) (Şekil 2.13) biyolojik olarak aktif bir pentasiklik triterpenoid bileşik olup birçok gıda ve şifalı bitkileri içeren 1620'den fazla bitki türünden izole edilmiştir. Oleaceae familyasına ait bitkilerde özellikle yaygın olan bu bileşik çoğu zaman ursolik asit (3β-hidroksiurs-12-en-28-

oik asit) izomeri ile birlikte bulunur ve birçok farmakolojik özellikleri birlikte paylaşırlar (Pollier ve Goossens, 2012). Oleanolik asit gibi konjuge olmayan triterpenoidler bitkilerin epikutikular mumlarında bulunurlar ve su kaybının önlenmesi ve patojenlere karşı ilk savunma bariyeri olarak görev alırlar. Örneğin, zeytin yapraklarında oleanolik asit hemen hemen saf kristaller halinde bulunarak mantar saldırısına karşı fiziksel bir bariyer oluşturur. Oleanolik asit sadece bir serbest asit olarak ortaya çıkmaz aynı zamanda triterpenoid saponinler için bir aglikon ön maddesi olarak da görev alırlar. Bitkilerde çeşitli glikokonjüge oleanolik asit molekülleri allelopatik ajanlar olarak veya patojenler veya otoburlara karşı savunma bileşikler olarak da işlev görebilir (Taiz ve diğ., 2015).



Şekil 2.13. Oleanolik asidin yapısı (Liu, 1995).

2.2.6.1.3 Ursolik ve oleanolik asitlerin sağlık üzerine etkileri

Bugüne kadar damaran, ergostan, fridelan, lupan, tarakastan ve ursan içeren yaklaşık 20 bin triterpenoid tıbbi bitkilerin çeşitli yerlerinden tanımlanmıştır. Antimikrobiyal ajan, antikanser, antienflamatuar olarak kullanılmak üzere çeşitli bitki türevli sikloskualenoid moleküllerin potansiyeli üzerinde durulmuştur. Çeşitli terpenoidler arasında pentasikliktriterpenoidlerin antienflamatuar, kemoprevantif ve kanser önleyici özelliklere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda (Neto, 2010; Khoo, 2011; Machado ve diğ., 2012; Jesus ve diğ., 2015) gösterilmiştir.

Ursan tipi pentasikliktriterpenik asit olan ursolik asit, sikloskualenoid ailesine aittir ve *Arctostaphylosuva-ursi* (L.) Spreng, *Vaccinium macrocarpon* Air., *Rhododendron hymenanthos* Makino, *Rosemarinus officinalis*, *Eriobotrya japonica*, *Calluna vulgaris*, *Ocimum sanctum* ve *Eugenia jambolana* gibi doğal şifalı bitkilerin meyveleri ve yapraklarında ve elma, armut, erik ve diğer meyvelerin balmumuna benzer koruyucu tabakalarında bulunur. Son çalışmalar, enflamasyon kaynaklı kanserlerin

çeşitli tiplerini içeren çeşitli insan hastalıklarında ursolik asidin yararlı etkilerini desteklemiştir. Ursolik asidin, antienflamatuar, antiproliferatif, proapoptotik, antimetastatik, antianjiyojenik potansiyeli kanserin *in vitro* (Çizelge 2.5) ve *in vivo* (Çizelge 2.6) modellerinde rapor edilmiştir (Shanmugam ve diğ., 2013).

En büyük etkiye sahip paraziter hastalık sıtmadır. Dünya nüfusunun yaklaşık % 40'nı etkiler ve 100'den fazla ülkeye yayılmıştır. Etiyolojik ajanı *Plasmodium* cinsine ait bir protozodur. Farklı ilaçlar bu paraziti ortadan kaldırabilir ancak bazı *Plasmodium* türleri direnç gösterebilmektedir. Bu nedenle yeni bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. *Uapacanitida* kök kabuklarından saflaştırılan ursolik asidin etanol ekstraktı, 36.5 µg/mL IC₅₀ ve 28 µg/mL IC₅₀ ile sırası ile klorokin-dirençli ve klorokin-duyarlı suşlara karşı antimalaryal etki gösterirken oleanolik asit etanol ekstraktı için 88.8 µg/mL IC₅₀ ve 70.6 µg/mL IC₅₀ değerleri etkili olmuştur (Jesus ve diğ., 2015).

Tsai ve Yin (2008) çalışmalarında PC12 hücrelerinde oksidatif ve enflamatuvar hasarı uyarmak için hidrojen peroksit ve MPP⁺ kullanarak enzimatik antioksidan sistemlerde ursolik ve oleanolik asitlerin etkilerini araştırmışlardır. Ursolik asit ve oleanolik asit ön uygulamasının PC12 hücrelerinde hidrojen peroksit ve MPP⁺ ile uyarılmış hasara karşı oksidatif ve enflamatuvar strese azalmaya ve hücre canlılığında önemli derecede bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Ursolik ve oleanolik asidin özellikle hepatit ve HIV virüslerine karşı antiviral özellikleri 1990'lardan beri çalışılmıştır. Karakteristik olarak yavaş ve ilerici enfeksiyon üreten HIV, Retroviridae familyasına ve *Lentivirus* cinsine aittir. *Cynomorium songaricum*'dan saflaştırılan ursolik asit doza bağlı bir şekilde (IC₅₀, 8 µg/mL), HIV-1 proteazininhibe etmiştir. Oleanolik asit ve türevleri de 4-20 µg/mL IC₅₀ ile HIV-1 proteazininhibe etme yeteneğine sahip bulunmuştur. Ursolik ve oleanolik asidin potansiyeli Hepatit B ve C virüslerine karşı da belirlenmiştir (Jesus ve diğ., 2015).

Ursolik ve oleanolik asit normal ve alloksana bağlı diyabetik farelerde kan şeker seviyelerini düşürmüştür. Bu asitlerin önemli derecede antienflamatuar özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Her iki asit de laboratuvar hayvanlarında kimyasal olarak uyarılmış karaciğer hasarını korumada etkili bulunmuştur. Oleanolik asit, Çin'de insan karaciğer bozuklukları için bir ilaç olarak pazarlanmıştır (Leela, 2002).

Oksidatif stres, Parkinson hastalığı gibi bazı nörolojik bozuklukların oluşumunda etkindir. Bu nedenle nöronal hücreler için antioksidatif koruma sağlayıcı ajanların keşfi önem

kazanmaktadır. Ursolik ve oleanolik asidin nörokoruyucu etkilerine dikkat çekilmiştir. Bu iki bileşiğin sinir büyüme faktörü kuvvetlendirici aktivitesine sahip olduğu ve oksidatif hasarı indükleyen amiloid beta proteini azaltabildiği rapor edilmiştir. PC12 hücre dizileri, sıçan böbreküstü bezi feokromositom hücre dizileridir ve antioksidan koruma veya sinir hücrelerinin hayatta kalma çalışmaları için bir model olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) veya MPTP'nin aktif metaboliti MPP⁺ nöronal hücreler ve hayvan beyinde reaktif oksijen veya serbest radikallerin oluşumunu düzenleyebilir bu nedenle bu ajanlar oksidatif ve/veya hasarı uyarmak için nörolojik çalışmalarda yaygın şekilde kullanılır (Tsai ve Yin, 2008).

Ursolik asit ve oleanolik asit türevlerinin antiproliferatif (çoğalmaya karşı) aktiviteleri üç tümör hücre dizilerinde (HepG2 karaciğer, MCF-7 meme ve Caco-2 bağırsak) ölçülmüştür. 2- α -hidroksiursolik asit ve maslinik asidin kumaril esterleri (2- α -hidroksioleanolik asit) etkili inhibitörler olarak tespit edilmiştir. Ursolik asidin birçok farklı hücre tipinde apoptozu indüklemeye (hücresinin kendi kendini yok etmesini uyarması) yeteneğinde antiproliferatif (çoğalmaya karşı) aktivitesinin önemli bir rol oynadığı muhtemeldir. Ursolik asit, HT-29 kolon hücrelerinde kaspaz-3, 8 ve 9 aktivasyonu ile birlikte apoptozun indüksiyonu ile çoğalmasını azaltır (Neto, 2010).

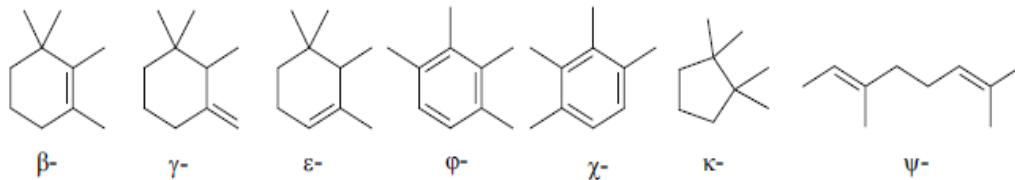
Diş çürümeye yol açan *Streptococcus mutans* tarafından ham glikosiltransferaz ile katalizlenen çözünmeyen glukanın sentezini her iki triterpen de inhibe etmiştir. Böylece bu bileşiklerin dişlerde çürük önleyebileceği ortaya konulmuştur. İnsan nüfusunun üçte birini etkileyen ve dünya çapında en çok ölüme neden olan enfeksiyon etmeni *Mycobacterium tuberculosis* bakterisine karşı kullanıldığında *Lantana hispida*'dan izole edilen oleanolik asidin 25 $\mu\text{g/mL}$ MIC değerinin etkili olduğu açıklanmıştır. Oleanolik aside benzer şekilde *Chamaedorea peji* loteyapraklarından saflaştırılan ursolik asidin de 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de *M. tuberculosis*'i ortadan kaldırma yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. Her iki bileşiğin de bu patojeni öldürme potansiyelinde olduğu bildirilmiştir (Jesus ve diğ., 2015).

2.2.7 Tetraterpenler (ψ,ψ -karoten)

Tetraterpenler sınıfını oluşturan bileşikler; karotenoidler, apokarotenoidler, diapokarotenoidler, megastigmanlardır (Breitmaier, 2006). Fotooksidasyondan fotosentetik dokuları koruyan ve fotosentezde yardımcı pigment olarak işlevi olan kırmızı, turuncu ve sarı karotenoidler, tetraterpenlerdir. Absisik asit hormonu (C15 terpen), karotenoid ön maddesinin

parçalanması ile üretilir (Taiz ve diğ., 2015). Karotenler (tetraterpenler) fotosentez yapan bitkilerde bulunan yoğun kırmızı ve sarı pigmentlerin büyük bir grubudur. Karotenoidler (oksijen içermeyen karotenler) antioksidan aktivite gösteren ve bitki ve hayvanlarda yaygın şekilde dağılım gösteren yağda çözünen pigmentlerdir. Bağışıklık sistemini güçlendirerek, göz hastalıkları, kalp hastalıkları, felç, özellikle bazı kanserler ve hastalıkların riskini azaltarak sağlık üzerine fayda sağlarlar. Karoten ve ksantofiller karotenoidleri oluşturan iki tip moleküldür. Vitamin A öncüsü olarak esansiyel bir besin gibi rol alırlar. Sebze suyundaki karotenoidler düşük-karotenoid tüketen kişilerde bağışıklık sistemini iyileştirebilmektedir. γ -karoten, likopen ve lutein sindirim yolu, rahim, prostat, meme, kolorektal, akciğer kanserlerine karşı koruma sağlar (Jain ve Ramawat, 2013).

Yaklaşık 200 kadar doğal olarak yaygın tetraterpen bugüne kadar bilinmektedir ve karotenoidler olarak ifade edilmektedir. Genel olarak yaygın bulunan karotenler Şekil 2.14'de gösterilmiştir. Asiklik tetraterpen likopen, domateste ve kuşburnu gibi diğer meyvelerde oluşur. Karotenoidler tüm yüksek bitkilerin (kurutulmuş bitki materyalinin % 0.1'i kadar) yaprakları, sürgün ve köklerinde oluşur. Terminal parçalarının ayrılması ile karotenoidlerden ayrılan terpenoidler apokarotenoidlerdir. β -iyonon gibi megastigmanlar, birçok bitkinin çiçeklerinde β -karotenin en önemli hoş kokulu parçalanma ürünlerine aittir (Breitmaier, 2006).



Şekil 2.14. Karoten olarak tanımlanan ve bilinen yedi son grup (Breitmaier, 2006).

2.2.8 Politerpenler (tüm trans poli izopren) ve prenilkuinonlar

İnsanlar tarafından yaygın olarak tanınan ve kullanılan terpen kauçuktur. Kauçuk, izoprenin tekrarlayan alt birimlerinden oluşan bir politerpendir. Diğer önemli terpenler; kamfor, mentol, piretroidler (böcek öldürücü), temizleyiciler, anti-alerjik ajanlar ve çözücüler içerir. Reçine (diterpen), limonen, karvon, nepetalakton (katnıpte), hekojenin (deterjan), dijitoksijenin de önemli terpenlerdir (Zwenger ve Basu, 2008). Fenilalanin ve tirozin aminoasitlerinden biyogenetik olarak türetilen çeşitli yağda çözünür prenilbenzokuinonlar, hemen hemen tüm

aerobik organizmaların (bakteri, bitki hayvan) hücrelerinde oluşur ve bu nedenle ubikinonlar şeklinde ifade edilirler (Breitmaier, 2006).

Çizelge 2.5.Ursolik asit ve türevlerinin *in vitro* koşullarda kanser önleyici etkileri (Shanmugam ve diğ., 2013).

Biyolojik Etkiler

Plazma hücre kanseri (Multiplmiyelom)

STAT3 aktivasyonunu ortadan kaldırma.

cSRC ve JAK1/2 kinazların yukarı yönde aktivasyonunu ortadan kaldırma.

Prostat kanseri

LnCaP hücrelerinde STAT3 aktivasyonu ile uyarılmış IL-6 ve NF-κB aktivasyonu ile uyarılmış TNF'yi ortadan kaldırma.

Doz ve zamana bağlı bir şekilde HER2'nin durumu ne olursa olsun CXCR4 işlevini aşağı doğru regüle etme.

PC3 hücrelerinde otofajiyi uyarma ve LC3-II'nin işlevini (ekspresyonunu) iyileştirme.

Beclin-1 ve Akt/mTOR yolu ile apoptosisi (programlı hücre ölümü) uyarma.

Meme kanseri

Apoptoz indüksiyonu ile çoğalmasını engelleme.

Fas reseptörü, kaspaz 3 ve PARP ve mitokondriyal yolla MDA-MB-231'de apoptosisi uyarma.

Rapamisinsinyallemesinin memeli hedefi, Akt ve c-Jun N-terminal kinaz modülasyonu ile göç ve işgali ortadan kaldırır.

MCF-7 hücrelerinde FoxM1'in ekspresyonunu (işlevini) engelleme.

Karaciğer (Hepatosellüler) kanseri

HIF-1α, βFGF, VEGF, IL-8, uPA, ROS ve NO'inhibe ederek anjiyogenezi ortadan kaldırma.

Hepatoma büyüme engelleme (inhibe etme).

S fazında hücre döngü durmasını ve kaspaz 3'ün aktivasyonu ile apoptosisi uyarma.

Mesane kanseri

IRE1-TRAF2-ASK1 sinyal kompleksini uyarma ve Apoptotik ASK1-JNK sinyalini aktive etme.

AMPK kinazı uyarma ve hücre çoğalmasını engelleme.

G1 fazında hücrelerin çoğalmasını (proliferasyonunu) engelleme ve ROS üretiminde artışla apoptosisi uyarma.

Kolorektal kanser (karsinom)

Apoptisi uyatarak TRAIL'e karşı kolon kanser hücrelerini duyarlı hale getirme.

Hücre ölümünü indüklemek ve JNK yolu ile otofajiyi düzenlemek.

NF-κB ile düzenlenen (regüle edilen) siklin D1, MMP-9, ICAM-1, VEGF, c-FLIP survivin, Bcl-2, Bcl-xL gen ürünlerini aşağı doğru regüle etme (düzenleme).

Pürinerjik alıcı (reseptör) P2Y (2) / Src / p38 / Cox 2 yolu ile düzenleyerek apoptosisi uyarma.

SW480 and SW620'de çoklu ilaç direncini ters çevirme.

Çizelge 2.5.Ursolik asit ve türevlerinin *in vitro* koşullarda kanser önleyici etkileri devamı (Shanmugam ve diğ., 2013).

Biyolojik Etkiler

Yumurtalık kanseri

Hücre çoğalmasını ortadan kaldırma, ERK'nınfosforilasyonunu yukarı doğru düzenleme ve etkin bir şekilde ikiye ayrılmış PARP ve 9 ve 3 kaspazı uyarma.

Survivin, c-Myc ve astrosit yüksek genin işlevini aşağı doğru düzenleme.

Pankreas kanseri

PI3 K/AKT/NF-κB ve JNK yolu ile MIA-PaCa-2, PANC-1 ve Capan-1'in çoğalmasını engelleme.

Sitotoksiteyi ve AsPC-1 hücrelerinde NOXA, p53, p21 ve waf1'i uyarma.

HL60 monositler ve kronik miyeloid (iliksel) lösemi hücreleri

K562 hücrelerinde mitokondriyal yol ile aktive ederek, PTEN'ninyukarı ve Akt'nin aşağı doğru düzenlenmesi ile apoptosisi uyarma.

ERK aktivasyonu ile C/EBPb'yi yukarı doğru düzenleme ve HL60 monosit farklılaşmasını uyarma.

HL60/ADR ve K562/ADR'deçoklu ilaç direncini ters çevirme.

Akciğer karsinomu

Doz ve zamana bağlı bir şekildeA549, H3255 ve Calu-6'da apoptosisi uyarma.

Beyinsel habis (Nöronikgliyoblastom) (astroitom)

TGF-beta1/miR-21/PDCD4 yolunu ortadan kaldırarak U251 insan glioblastoma hücre hatlarında apoptozisi uyarma ve çoğalmayı engelleme.

Çizelge 2.6.Ursolik asit ve türevlerinin *in vivo* antikanser etkileri (Shanmugam ve diğ., 2013).

Etkiler

Prostat karsinom (hayvan modeli: erkek Balb/c çıplak fare) - intraperitoneal enjeksiyon

200 mg/kg vücut ağırlığı dozda erkek Balb/c çıplak farelerde deri altından implante neoplaziyi durdurma.

VEGF'nin ekspresyonunu azaltma ve tümör dokularında kaspaz-3'ün ekspresyonunu artırma.

Fare prostatının transgenik adenokarsinomu (hayvan modeli, TRAMP)-diyet doz (%1, w/w)

Ursolik asit, TRAMP sıçanlarında prostatik epitel içi neoplazi oluşumunu geciktirir ve PIN'nin adenokarsinoma ilerlemesini inhibe etme. Uzun süreli genel sağkalım ve toplam vücut ağırlığı üzerinde herhangi bir önemli etkisi olmadan tümör gelişimini belirgin bir şekilde azaltma.

COX-2, siklin D1 ekspresyonunu aşağı yönde kaspaz-3'ün ekspresyonunu yukarı yönde düzenleme.

36 haftalık yaşlı TRAMP farelerin tümör dokularında CXCR4 ekspresyonunu azaltma.

Hepatosellüler karsinom (hayvan modeli: Kunming fareler) - intraperitoneal enjeksiyon

Doza bağlı bir şekilde deri altından implante tümör büyümesini inhibe etme.

Hepatosellüler karsinom (hayvan modeli: Wistar sıçan) - ağızdan beslenme

Fenobarbital destekli ve dietilnitrozamin ile uyarılmış karaciğer kanserini inhibe etme.

Wistar sıçanlarının karaciğerinde serbest radikaller ve oksidatif stresi azaltma.

Kolorektal karsinom (hayvan modeli: erkek çıplak fareler) - intraperitoneal

Ortotopik fare modelinde kolon adenokarsinomasını inhibe etme. Bu etki, kapesitabin mevcudiyetinde gelişir.

NF-kB, STAT3 ve β -kateninin baskı kontaminasyonu ile CD31 mikrodamar yoğunluğu ve proliferasyon belirleyicisi Ki67'yi inhibe etme.

Aşağı yönde düzenlenmiş hücre sağkalım proteinleri, DR5 ve DR4 ölüm reseptörlerini uyarma.

Kolon anormal kript odağı (hayvan modeli: Sprague-Davley sıçan) - diyet dozu (% 0.11 w / w)

Kolon anormal kript odağı kaynaklı azoksimetanın gelişimini azaltma.

Lösemi (hayvan modeli: NOD / SCID fareleri) - intraperitoneal enjeksiyon

Doza ve zamana bağlı bir şekilde insan lösemi hücrelerinde apoptozu (programlı hücre ölümü) uyarma.

PKB/JNK yolunu aşağı yönde düzenleme, apoptoz ve kaspaz aktivasyonuna neden olma.

Meme karsinoması (hayvan modeli: ovariektomi dişi C57BL / 6 fareleri) - diyet doz

Meme yağ tabanına enjeksiyonu singeneik MMTV Wnt1 meme tümörlerini inhibe etme.

AKT / mTOR sinyal yolunu inhibe etme ve tümörlerde apoptozu uyarma.

2.3. Konu İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Janicsák ve diğ. (2003), Lamiaceae familyasına ait 5 medikal bitkinin ursolik ve oleanolik asit içeriğini belirlemişlerdir. Sokselet tekniğiyle elde ettikleri ekstraktları GC ile analiz etmişlerdir. Bitkilerden *Salvia officinalis* L. en yüksek ursolik asit (% 1.861) ve oleanolik asit içerirken (% 0.653) onu *Melissa officinalis* L. (%0.612 ve %0.170), *Satureja montana* L. (%0.507 ve %0.138), *Hyssopus officinalis* L. (%0.407 ve %0.143) ve *Marrubium vulgare* L. (%0.032 ve %0.016) izlemiştir. Çalışmalarında metanol, aseton, benzen, etil asetat ve %70'lik etil alkol arasında en etkili çözücünün metanol olduğunu; sokselet, ultrason destekli ve karıştırıcı yardımıyla klasik ekstraksiyon teknikleri arasında en etkilisinin sokselet olduğunu saptamışlardır.

Vági ve diğ. (2005), mercanköşk (*Origanum majorana* L.) bitkisinden sokselet ve süperkritik akışkan CO₂ (SCF- CO₂) ile antioksidan bileşikleri, ursolik asit, karnosik asit ve karnosolu ekstrakte edip HPLC ile miktarlarını belirlemişlerdir. Sokselet ekstraksiyonda iki farklı çözücü (etanol ve n-hekzan), SCF-CO₂'de 50 °C ve 450 bar koşullarını kullanmışlardır. Macaristan ve Mısır orjinli 2 bitkide yaptıkları çalışmada, en yüksek ursolik asit verimini Macaristan orjinlide etanolle (% 4.304), Mısır orjinlide n-hekzanla (% 4.043) elde etmişlerdir. Her iki örnekte de SCF- CO₂ değerleri diğer tekniklerle elde edilenden daha düşük bulunmuştur.

Janicsák ve diğ. (2006), Lamiaceae familyası 88 taksona (19 cins, 66 tür, 8 alt tür, 9 varyete ve 5 hibrit) ait bitkinin ursolik ve oleanolik asit içeriğini belirlemiştir. Ursolik asit içeriği iz miktardan kuru maddede %4.019'a kadar değişmiştir. En yüksek içerik *Salvia lavandulifolia* Vahl. (%4.019), *Salvia officinalis* L. (%3.825) ve *Nepeta x faassenii* Berg. (%2.923) bitkilerinde bulmuşlardır. Oleanolik asit içeriği ise iz miktardan kuru maddede %1.840'a kadar değişmiştir. En yüksek içerik *Salvia lavandulifolia* Vahl. (%1.840), *Salvia officinalis* L. (%1.559) ve *Nepeta x faassenii* Berg. (%1.416) bitkilerinde bulunmuştur. En düşük oleanolik asit içeriği *Marrubium alysson* (%0.009) ve *Marrubium thessalum* (%0.009)'da kaydedilmiştir.

Lacikova ve diğ. (2006), Çin'de yetişen bir bitki olan *Staphylea* L.'e ait 4 farklı türde (*Staphylea pinnata* L., *S. holocarpa*, *S.colchica*, *S.elegans*) ursolik asit tayini yapmışlardır. Kurutulmuş *Staphylea* L. bitki yapraklarını 48 saat kloroformda oda sıcaklığında ekstrakte etmişler, ölçümleri tandem kütle spektroskopisinde (MS-MS) gerçekleştirmişlerdir. Sonuç

olarak *Staphylea pinnata* L., *S. holocarpa*, *S.colchica* ve *S.elegans* türlerinde ursolik asidi sırasıyla ortalama % 0.16, % 0.08, % 0.12 ve % 0.1 olarak tespit etmişlerdir.

Kowalski (2007), 3 *Silphium* türünün (*Silphium perfoliatum*, *Silphium trifoliatum* ve *Silphium integrifolium*) farklı vejetatif ve generatif organlarındaki ursolik ve oleanolik asit içeriğini, *Panax quinquefolium* kökleri ve *Calendula officinalis* çiçeklerindeki ile karşılaştırmışlardır. Ursolik asit miktarının *Silphium trifoliatum* ve *Silphium integrifolium*'de yüksek miktarda bulunduğunu çiçeklenmeden önce yapraklarda 14.98 mg/g k.m'de, çiçeklenme dönemindeki yapraklarda ise 15.50 mg/g k.m'de olduğunu saptamışlardır. *Silphium trifoliatum* ve *Silphium integrifolium*'in çiçek salkımlarında kuru maddede oleanolik asit sırasıyla 22.05 mg/g ve 17.95 mg/g, *Calendula officinalis* çiçeklerinde ise 20.53 mg/g olarak bulunmuştur. *Silphium* yapraklarında en yüksek oleanolik asit içeriğine (17.03 mg/g, k.m) Mayıs ayında rastlanmıştır. Amerikan Ginsenginin (*Panax quinquefolium*) köklerinde ursolik asit bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Razboršek ve diğ. (2007), GC-MS ile biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) terpenoik asit içeriğini araştırmışlar, sonuçları adaçayına ait türlerin (*Salvia officinalis* L., *Salvia sclarea*, *Salvia glutinosa*) ve geyik otunun (*Satureja montana*) bulgularıyla karşılaştırmışlardır. Oleanolik asidi biberiyede 2.42 mg/g, geyik otunda 10.68 mg/g, *Salvia officinalis* L., *Salvia sclarea* ve *Salvia glutinosa* sırayla 10.91, 4.31 ve 3.71 mg/g olarak belirlemişlerdir. Ursolik asidi ise biberiyede 1.89 mg/g, geyik otunda 6.67 mg/g, *Salvia officinalis* L., *Salvia sclarea* ve *Salvia glutinosa* sırayla 4.15, 1.01 ve 2.39 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Çözücü olarak tetrahidrofuran, diklorometan, etil asetat, aseton, metanol, etanol, toluen, hekzan ve pridini kullanmışlar ve en iyi sonucun tetrahidrofuran:etanol (1:1) karışımıyla elde edildiğini bildirmişlerdir.

Zhou ve diğ. (2007), Çin'de medikal amaçlı kullanılan yeni dünya (*Eriobotrya japonica* Lindl.) meyvesinin çiçeklerinin amigdalin, oleanolik ve ursolik asit içeriklerini HPLC ile belirlemişlerdir. 5 yenedünya çeşidinde ursolik asidi 2.15-2.68 mg/g, oleanolik asidi 0.38-0.51 mg/g ve amigdalini 1.23-1.56 mg/g aralığında belirlemişlerdir. Farklı gelişme zamanlarında ve çiçeğin farklı dokularında (taç yaprağı, çanak yaprağı, dişilik organı+erkek organı ve sapçık) bu üç bileşenin önemli derecede değiştiğini kaydetmişlerdir. Ursolik asidi en düşük çiçeğin taç yaprağında (0.60 mg/g) en yüksek çanak yaprağında (3.65 mg/g) belirlemişlerdir.

Frighetto ve diğ. (2008), farklı elma çeşitlerinin kabuklarından kloroform, etil asetat ve/veya etanol ile ursolik asit özütlemişlerdir. Ham ekstraktları yüksek hızlı ters akım kromatografisiyle (HSCCC) saflaştırmışlardır. Saflık kontrollerini GC-MS, ¹³C nükleer manyetik rezonans (¹³C NMR), infrared, ince tabaka kromatografi ve GC-FID ile yapmışlardır. HSCCC tekniğinin bitkisel kaynaklardan ursolik asitin saflaştırılması için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Gnoatto ve diğ. (2008), Yerba mate (*Ilex paraguariensis*), mate çayı olarak bilinen ve Paraguay çayında bulunan saponinlerden olan ana triterpen olan ursolik asitin tümör hücreleri üzerine baskılayıcı etkilerini incelemişlerdir. Kurutulmuş mate çaylarını etil alkolle ekstrakte etmişler ve yaklaşık % 0.26 ursolik asit belirlemişlerdir.

Razboršek ve diğ. (2008), GC-MS ile Lamiaceae familyasına ait bazı bitkilerin (*Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Satureja montana* L., *Salvia sclarea* L. ve *Salvia glutinosa* L.), oleanolik, betulinik ve ursolik asit içeriklerini araştırmışlardır. Oleanolik ve ursolik asit içeriklerini çoktan aza doğru *Rosmarinus officinalis* L. (%0.909 ve %1.580), *Salvia officinalis* L. (%0.756 ve %1.516), *Satureja montana* L. (%0.536 ve %0.094), *Salvia sclarea* L. (%0.095 ve %0.091) ve *Salvia glutinosa* L. (%0.090 ve %0.191) olarak kaydetmişlerdir.

Silva ve diğ. (2008), Brezilya’da yetişen 8 Ocimum çeşidinin (*O. americanum* L., *O. basilicum* L., *O. basilicum* var *purpurascens* Benth, *O. basilicum* var. *minimum* L., *O. gratissimum* L., *O. micranthum* Willd, *O. selloi* Benth. ve *O. tenuiflorum* L.) ursolik asit içeriğini HPLC ile belirlemiştir. Ursolik asit içeriğini en yüksek *O. tenuiflorum*’da (%2.02), en düşük *O. basilicum* var. *minimum* L. (% 0.27)’de belirlemişlerdir.

Wang ve diğ. (2008), *Macrocarpium officinale* (Sieb. et Zucc.) Nakai’nin ursolik asit ve oleanolik asit içeriğini belirlemişlerdir. Halk hekimliğinde önemli yer tutan bu meyvenin terpenoik asit içeriğini belirlemede HPLC ve TLCS teknikleri kullanılmıştır. Oleanolik içeriğini HPLC ile %0.050 ile %0.082 arasında saptamışlardır. Ursolik asit içeriğini TLCS ile % 0.155-0.294, HPLC ile %0.107-0.170 arasında belirlemişler, TLCS sonuçlarının daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Meyve etine göre dış kısmın daha fazla ursolik asit içerdiğini, saponinlerin dış kısımda (ekzokarp) ve paraneşima hücrelerinin dışında yerleştiğini bildirmişlerdir. Aylara göre terpenoik asitlerin değiştiğini tespit etmişlerdir.

Jäger ve diğ. (2009), 39 bitkinin triterpen içeriğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, ursolik asit içeriğini ayı üzümü yapraklarında 1.24 g/100g, kahve yapraklarında 1.80 g/100g,

kızılıçık yapraklarında 0.15 g/100g, alıç yaprak ve çiçeklerinde 0.52 g/100g, okalüptüs yapraklarında 1.17 g/100g, lavanta çiçeklerinde 1.05 g/100g ve yapraklarında 1.59 g/100g, elma kabuklarında 1.43 g/100g, elma pulpunda 0.86 g/100g, melisa otu yapraklarında 0.67 g/100g, zakkum yapraklarında 1.27 g/100g, zeytin yapraklarında 0.18 g/100g, mercanköşk yapraklarında 0.66 g/100g, kekik yapraklarında 0.8 g/100g, armut kabuklarında 0.20 g/100g, biberiye yapraklarında 2.95 g/100g, adaçayı yapraklarında 1.80 g/100g, mürver yemişi yapraklarında 0.58 g/100g, geyik otu yapraklarında 0.49 g/100g ve kekik yapraklarında 0.94 g/100g olarak bildirmişlerdir.

Kim ve Wampler (2009), HPLC ile değişik çayların saponin içeriğini belirlemişler, sonuç hesaplamada saf ursolik asit kullanmışlardır. Yeşil çayda 75.09 mg/L, siyah çayda 77.32 mg/L saponin belirlemişlerdir.

Lee ve diğ. (2009), medikal özellik taşıyan Kore ve Çin menşeli 15 farklı *Prunella spica* bitkisinin terpenik asit içeriğini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, en yüksek verimi %90 etil alkol ve ultrason destekli ekstraksiyon tekniğinde belirlemişlerdir. Ursolik asidi Kore’de yetişenlerde 58-177 µg/g, Çin’de yetişenlerde ise 140-206 µg/g aralığında bulmuşlardır.

Schneider ve diğ. (2009), çeşitli solventlerde ursolik ve oleanolik asidin eriyebilirliğini karşılaştırmışlardır. Ursolik asidin çözünürlüğünü çoktan aza doğru; dioksan (18.8 mg/ml), n-bütanol (16.3 mg/ml), n-hekzan (13 mg/ml), metanol (7.6 mg/ml), etanol (5.1 mg/ml), aseton (4.7 mg/ml), siklohekzan (4.2 mg/ml) ve etil asetat (3.71 mg/ml) şeklinde literatürde yer aldığını bildirmiştir.

Zacchigna ve diğ. (2009), *Plantaginaceae* familyasına aitsinir otu (*Plantago major* L.) bitkisinin ursolik ve oleanolik asit içeriğini araştırmışlardır. Çalışmada, çözücü olarak metanol, ekstraksiyon tekniği olarak sokselet kullanmışlar, analizi HPLC ile gerçekleştirmişlerdir. Bu bitkinin yapraklarında % 0.8 ursolik asit ve % 0.2 oleanolik asit belirlemişlerdir.

Fang ve diğ. (2010), Çin’de halk hekimliğinde kullanılan *Chaenomeles sinensis* meyvesinden ursolik ve oleanolik asitin mikrodalga yardımıyla ekstraksiyonunu optimize etmişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşullarını mikrodalga gücü 600 W, sıcaklık 52 °C, çözücü:kati oranı 32 ml/g ve ekstraksiyon süresi 7 dakika olarak belirlemişlerdir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum noktada buldukları terpenoik asit içeriğini ultrason destekli ekstraksiyon, sokselet ekstraksiyon ve geri soğutucu yardımıyla ekstraksiyon teknikleriyle

karşılaştırmışlardır. Optimum noktada ursolik asiti mikrodalga destekli ekstraksiyonda %1.126 olarak belirlemişler, diğer tekniklere göre daha az çözücü ve sürede en yüksek verim elde etmişlerdir.

Li ve diğ. (2010), farklı yerlerden alınan *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, *I. latifolia* Thunb, *I. pentagona* S.K Chen, Y. X. Feng et C.F. Liang, *I. cornuta* Lindl, *I. huoshanensis* Y.H. He ve *I. entochinensis* X.Y. Hu'nin infüzyonu olan Kuding çayının HPLC ile ursolik ve oleanolik asit içeriğini belirlemişlerdir. Farklı tür ve orjinden sağlanan örneklerden en yüksek ursolik asit içeriğini *I. cornuta* Lindl. (%1.93)'te, en düşük *Ilex kudingcha* C.J. Tseng'in filizlerinde (<% 0.28) belirlemişlerdir.

Tarvainen ve diğ. (2010), sinir otunun (*Plantago major*) tohum ve yapraklarından sokselet ve süperkritik akışkan- CO₂ ile ursolik asit ve oleanolik asit ekstrakte etmiş, katı faz ekstraksiyonla saflaştırmış, LC-(UV)-APCI-MS ve LC-MS ile miktarlarını tespit etmişlerdir. Sokseletle ekstraksiyonda çözücü olarak yaprakta dietil eter, metanol, etanol ve %70'lik etanol; tohumda dietil eter, metanol ve etanol kullanmışlardır. Yapraklarda en yüksek ursolik asit verimini metanol ve dietil eterle, tohumlarda ise dietil eterle elde etmişlerdir. Tohumlarda süperkritik akışkan- CO₂ ile ursolik asit verimi düşük olmuştur. Yapraklarda %0.22 ursolik asit ve %0.07 oleanolik asit, tohumlarda ise %0.007 ursolik asit ve %0.005 oleanolik asit belirlemişlerdir. Araştırmacılar, bitki materyallerinin ekstraksiyonunda saf metil alkolün hem yüksek penetrasyonu hem de çok polar bileşenleri daha iyi çözebilme yeteneği nedeniyle yaygın kullanıldığını ancak pentasiklik triterpen asitler için uygun olmadığını bildirmişlerdir. Sokselet ekstraksiyonda, süreyi uzatmanın verimi fazla etkilemediğini 6 saatin yeterli olduğunu rapor etmişlerdir. Süperkritik akışkan- CO₂ tekniğinin yapraklar için uygun olmadığını tohumlarda ise kullanılabileceğini; solvent ekstraksiyon metodlarında kullanılan toksik hidrokarbonların tersine karbondioksitin toksik olmadığı, kolayca ekstraktan uzaklaştırılabildiği, ekstraksiyon süresince yağın oksidasyonunu önlediği bildirilmiştir.

Tian ve diğ. (2010), Çin, Moğolistan, Türkiye, Kazakistan ve Kırgızistan'da doğal olarak yetişen bir bitki olan *Ziziphora clinopodioides* Lam'ın ursolik ve oleanolik asit içeriğini araştırmışlardır. Çözücü olarak metanol, ekstraksiyon tekniği olarak ultrason destekli ekstraksiyon, ayırmada HPLC kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, bu bitkinin 1.176 mg/g ursolik asit ve 0.76 mg/g oleanolik asit içerdiğini belirlemişlerdir.

Zhou ve diğ. (2010), 23 buruk, 9 buruk olmayan Trabzon hurması çeşitlerinin ursolik ve oleanolik asit içeriklerini HPLC ile belirlemişlerdir. Buruk çeşitlerde ursolik asidin iz

miktardan 27.64 µg/g'a, buruk olmayan çeşitlerde ise iz miktardan 12.23 µg/g'a kadar değiştiğini saptamışlardır.

Gotti (2011), şifalı bitkiler içinde fitokimyasal maddelerin analizinde elektromigrasyon yöntemlerin uygulamalarını incelemiştir. *Rabdosia japonica* ve *Piper kadsura* (Japon biber türü) bitkilerinde kimyasal ekstraksiyon işlemi ile ursolik asiti ekstrakte etmişlerdir. Kızılıcıkta yaptıkları çalışmada, en uygun ekstraksiyonun misel elektrokinetik kromatografi tekniğinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Kızılıcıkta ursolik asit içeriğini 0.3 mg/g olarak tespit etmiştir.

Kondo ve diğ. (2011), çeşitli *Vaccinium* türleri ve ürünlerinin ursolik asit içeriklerini belirlemişlerdir. En yüksek ursolik asidi (0.460-1.090 g/kg) ve esterlerini (0.040-0.160 g/kg) turna yemişi (*V. macrocarpon*) çeşitlerinde bulmuşlardır. Ursolik asidi kekreyemişde (*V. vitis-ideae* L.) 0.260 g/kg ve alçak boylu maviyemişde (*V. angustifolium*) 0.230 g/kg olarak belirlemişler, ancak bunlarda ursolik asit esterlerini saptamamışlardır. *V. oxycoccus*'da en düşük ursolik asit ve esterlerini (0.129 g/kg) belirlemişlerdir. Turna yemişinden elde edilen ürünler arasında özellikle tüm meyvenin dahil edilenlerde ursolik asit içeriğinin yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca, DU145 prostat tümör hücreleri üzerinde yaptıkları incelemede, ursolik asit ve esterlerinin çok düşük, mikromolarkonsantrasyonda tümör hücrelerinin gelişimini inhibe ettiklerini saptamışlardır.

Li ve diğ. (2011), bazı meyvelerde bulunan 5 triterpenik asidi (betulinik asit, betulonik asit, maslinik asit, ursolik asit ve oleanolik asit) akridon-9-etil-p-toluensülfonat (AETS) etiketleme (labeling) türevlendirme reaktifi kullanarak HPLC-flouresan dedektörle belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmada, yanıt yüzey yöntemi ve 3 değişkenli Box-Behnken tasarımı kullanarak akridon-9-etil-p-toluensülfonat ile türevlendirme reaksiyonunu optimize etmişlerdir. Değişken olarak triterpenik asitle AETS molar oranı, türevlendirme sıcaklığı ve türevlendirme süresini almışlardır. Ursolik asit içeriğini nar meyve, kabuk ve çekirdeğinde 1.09, 58.88 ve 0.78 µg/g; limon meyve etinde 0.91 µg/g ve kabuğunda 3.27 µg/g; mandalina kabuğunda 0.62 µg/g; Çin alıcının meyve etinde 930.75 µg/g, çekirdeğinde 2.98 µg/g; hünnap meyve etinde 25.48 µg/g ve kivi 7.67 µg/g olarak belirlemişlerdir.

Xia ve diğ. (2011), Çin'de halk hekimliğinde kullanılan *Ligustrum lucidum* meyvesinin ana bileşenlerinden olan ursolik ve oleanolik asidin mikrodalga destekli ekstraksiyonunda optimizasyon koşullarını belirlemişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşullarını: etil alkol konsantrasyonu %80, katı:sıvı oranı 1:15, süre 30 dakika, sıcaklık 70°C

olarak belirlemişlerdir. Bu koşullarda, oleanolik asiti 4.4 mg/g ve ursolik asit 5.8 mg/g olarak saptamışlardır.

Zhou ve diğ. (2011), 2 farklı yeni dünya (*Eriobotrya japonica* Lindl.) kültürünün farklı dokularında ursolik ve oleanolik asit içeriğini HPLC ile araştırmışlardır. Çalışma sonunda, meyvenin kabuklarının (4.45-7.50 mg/g k.m) meyve eti (0.12-0.13 mg/g k.m) ve çekirdeğinden (0.18-0.19 mg/g k.m) daha yüksek ursolik asit içerdiğini belirlemişlerdir. Meyvenin gelişimi sırasında ursolik ve oleanolik asit içeriğinde önemli değişimler olduğunu kaydetmişlerdir. En yüksek terpenik asit birikiminin Mayıs ayının ilk haftasında olduğunu saptamışlardır. Renge göre terpenik asit miktarının değişip değişmediğini de araştırmışlar. Meyve eti kırmızı olanlarla beyaz olan çeşitlerin kabuklarındaki ursolik ve oleanolik asit içeriği bakımından farklılık olmadığını saptamışlardır. Tam olgunlaşmış 24 yeni dünya çeşidinin kabuk kısmında ursolik asit içeriği 2.82 ile 8.20 mg/g k.m arasında bulunmuştur.

Li ve diğ. (2012), 8 farklı armut çeşidinin anti-inflamatuvar ve antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Bireysel fenolik bileşik ve triterpenoidleri belirledikleri çalışmada, ursolik asidi 37.8 ile 168.2 µg/g olarak saptamışlardır. Armutta bulunan flavanoid bileşiklerden arbutin ile ursolik ve oleanolik asidin antioksidan ve anti-inflamatuvar etkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Szakiel ve diğ. (2012), Finlandiya ve Polonya’da yetişen kekreyemiş (*Vaccinium vitis-ideae* L.) meyve ve yapraklarının GC-MS/FID ile triterpenoid kompozisyonunu belirlemişlerdir. Ursolik asit içeriğini, ağustos ayında Finlandiya’da yetişen meyve, genç yaprak ve yaşlı yapraklarda sırasıyla 6763.7, 1585.7 ve 3048.2 µg/g, Polonya’da yetişenlerde aynı sırayla 6040.3, 1878.8 ve 3158.2 µg/g olarak bulmuşlardır. Aralık ayında genç ve yaşlı yapraklarda triterpenoid profilinin değiştiğini kaydederek, ursolik asit içeriğinin Finlandiya orjinli genç yapraklarda 2330.6 µg/g ve yaşlı yapraklarda 2982.0 µg/g; Polonya orjinlilerde ise aynı sırayla 2728.2 ve 2970.2 µg/g olarak saptamışlardır. Ursolik asidin kekreyemiş meyvesinin baskın terpenik asidi olduğunu kaydetmişlerdir.

Xia ve diğ. (2012), *Ligustrum lucidum* Ait meyvesinden ursolik ve oleanolik asit eldesinde ultrason destekli ekstraksiyonunun optimizasyon koşullarını belirlemişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşullarını: etil alkol konsantrasyonu %95, katı:sıvı oranı 1:20, süre 10 dakika, sıcaklık 40 °C olarak kaydetmişlerdir. Bu koşullarda, oleanolik asiti 6.3 mg/g ve ursolik asit 9.3 mg/g olarak saptamışlardır. Çalışmalarında çözücünün etkisini belirlemek için; su, etanol, metanol ve bütanol kullanmışlardır. Etanol ve metanolle yaklaşık aynı verimi

almışlar, bütanoldeki verim bu çözücülerin yarısı kadar, suyla olan verim ise dörtte biri kadar olmuştur. Ursolik ve oleanolik asidin nispeten düşük polariteye sahip olup ekstraksiyon için su ve bütanole göre metanol ve etanolün daha uygun olduğunu, ancak metanolün toksik ve çevreye zararlı olması nedeniyle etanolü kullandıklarını bildirmişlerdir.

Taralkar ve Chattopadhyay (2012), Hindistan'da yetişen medikal özellikler taşıyan Verbenaceae familyasının bir üyesi olan *Vitexnegundo* Linn bitkisinin yapraklarından metanolle ursolik ve betulinik asit ekstrakte etmiş ve ters faz-HPLC ile analiz etmişlerdir. Çalışmada *Vitexnegundo* Linn bitkisinin yapraklarından ursolik asit ve betulinikasitin belirlenmesi için kullandıkları metodun doğru, duyarlı ve tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Vetal ve diğ. (2012), *Ocimum sanctum* yapraklarından ursolik asit ekstraksiyon kinetiği ve optimizasyonu üzerine çalışmışlardır. Çözücü olarak metanol, aseton, asetonitril ve etil asetat kullanmışlar, analizi HPLC ile gerçekleştirmişlerdir. Ursolik asit içeriğini, metil alkolle 11.21 mg/g, asetonitrille 9.86 mg/g, asetonla 9.23 mg/g ve asetonla 5.13 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Ekstraksiyonda 4 farklı sıcaklık derecesi (30, 40, 50 ve 60 °C) kullanmışlardır. 40 dakikaya kadar tüm sıcaklıklarda verimde artış belirlemişler, bu süreden sonra 60 °C hariç diğer sıcaklıklarda sabitleme eğilimi görülürken, 60 °C'de hızla düşüş kaydetmişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşullarını; süre 40 dakika, çalkalama hızı 1000 rpm sıcaklık 50°C, katı:sıvı oranı 1:120 olarak belirlemişlerdir. Bu koşullarda ursolik asidi verimini 11.21 mg/g, aktivasyon enerjisini 10.45 kJ/mol olarak saptamışlardır.

Xu ve diğ. (2012) yeni dünya (*Eriobotrya japonica* Lindl) yapraklarının ursolik ve oleanolik asit içeriğini HPLC ile araştırmışlardır. Yapraklarda ursolik asidi 5.6 mg/g, oleanolik asidi 1.4 mg/g olarak belirlemişlerdir.

Gambhava ve diğ. (2013), *Plumeria obtusa* bitkisinin ursolik asit içeriğini tespit etmişlerdir. Önce petrol eterle 70 °C'de su banyosunda 2 saat ekstrakte edilen örnekler daha sonra çözücüsü buharlaştırılıp metanolle çözülmüş ve HPTLC ile analiz edilmiştir. Bu bitkide ortalama % 0.197 ursolik asit tespit edilmiştir.

Silva ve diğ. (2013), *Plumeria rubra*'nın yapraklarında ursolik asit içeriğindeki değişimini 12 ay boyunca izlemişlerdir. Aylara göre ursolik asitin oldukça değiştiğini belirlemişlerdir. Ursolik asit içeriğini en yüksek Mayıs (% 16.40) ve Haziran (% 15.78), en düşük Aralık (% 8.57), Ocak (% 5.22), Şubat (% 8.74) ve Mart (% 0.27) aylarında olduğunu kaydetmişlerdir.

Vetal ve diğ. (2013), *Ocimum sanctum* yapraklarından ultrason destekli ekstraksiyonla ursolik asitin eldesini optimize etmiştir. Çalışmada farklı süre, katı sıvı oranı, sıcaklık, ultrason gücü ve frekansını denemişlerdir. Maksimum verimi (16.47 mg/g) 12 dakika, 1:30 katı:sıvı oranı, 45 °C sıcaklık ve 25 kHz frekans koşullarında elde etmişlerdir. Bu ekstraksiyon yöntemini klasik yöntemlerle karşılaştırıldığında daha iyi sonuç verdiğini ve sürenin de çok kısa olduğunu bildirmişlerdir.

Wójciak-Kosior ve diğ. (2013), *Lamii albi* flos bitkisinden triterpenik asitleri ekstraksiyonda klasik tekniklerle (maserasyon, sokselet, geri soğutucu yardımıyla ekstraksiyon) modern teknikleri (hızlandırılmış solvent ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon) karşılaştırmışlardır. En düşük verimi maserasyon (39.1 µg/g), en yüksek mikrodalga destekli ekstraksiyonla (110.4 µg/g) belirlemişlerdir. Çalışmalarında metanol, aseton ve etil asetat arasında en etkili çözücünün metil alkol olduğunu saptamışlardır.

Zhang ve diğ. (2013), Japonya marketlerinde satılan kurutulmuş 8 farklı meyve çeşidinin ursolik ve oleanolik asit içeriğini belirlemişlerdir. Kuru üzüm çeşitlerinde ursolik asite rastlamamışlardır. Yabanmersini, kayısı, kiraz ve Trabzon hurmasında ise baskın terpenik asit olarak ursolik asiti belirlemişlerdir. Kuru meyvelerden en yüksek ursolik içeriği turna yemişinde (65.9 mg/100g), en düşük ise trabzon hurmasında (1.03 mg/100g) saptamışlardır. Trabzon hurmasında belirledikleri değerin literatüre göre düşük olduğunu, bunun nedenini de kabuklarının olmamasına bağlamışlardır.

Yang ve diğ. (2013), *Scutellaria barbata* D. Don bitkisinde ursolik asit ve oleanolik asit ekstraksiyonunu bir ultrason destekli süperkritik akışkan karbondioksit ve geri soğutuculu bir ekstraksiyon sistemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Farklı değişkenlerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkilerini araştırmışlar, analizi UV dedektörle kombine edilmiş bir ters fazlı HPLC sistemi ile yapmışlardır. 55 °C’de ultrason destekli süperkritik karbondioksit akışkan kullanarak etanol su karışımlı sıvıda yapılan analiz sonucunda oleanolik asit verimini kurumaddede 14.14 µg/g ve ursolik asit verimini kurumaddede 59.27 µg/g olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar, % 80 etanolle 3 kez tekrarlanan geri soğutuculu ekstraksiyon tekniği ile karşılaştırıldığında ise, geri soğutuculu ekstraksiyonda oleanolik asit verimini kurumaddede 13.81 µg/g ve ursolik asit verimini kurumaddede 57.95 µg/g olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak zaman ve harcanan kimyasal açıdan ultrason destekli süperkritik

akışkan karbondioksit kullanarak yapılan ekstraksiyon tekniğinin daha verimli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bravo (2014), Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) Paraguay çayında bulunan ursolik asit ve diğer bileşiklerin sıçanlar üzerinde serum lipidlerinde ve antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. Paraguay çayından saponin grubu bileşik olan ursolik asiti metanolle ekstrakte etmişler DAD dedektörlü HPLC cihazı kullanmışlardır. Toplam saponin miktarını 5.5 mg/g bulmuşlardır. Toplam saponin içeriğinin % 64 ünü ursolik asit oluşturduğunu bildirmiştir.

Fu ve diğ. (2014), 4 farklı teknikle (maserasyon, çalkalamalı ekstraksiyon, geri soğutucuyla ekstraksiyon ve ultrason destekli ekstraksiyon) nar çiçeklerinden ursolik asit ekstrakte etmişlerdir. Çalışmada farklı çözücülerin ursolik asit verimi üzerine etkisini karşılaştırmışlar. Bu amaçla ethanol, n-bütanol, aseton, kloroform, etil asetat ve suyu çözücü olarak kullanmışlardır. Kullandıkları çözücülere göre verim büyükten küçüğe kloroform (9.21 mg/g), etil alkol (9.11 mg/g), aseton (8.56 mg/g), etil asetat (8.05 mg/g) ve su (0.07 mg/g) şeklinde değişmiştir. En yüksek verimi kloroformla ekstrakte ettiklerinde belirlemişler, ancak toksisitesi nedeniyle etil alkolle çalışmışlardır. Etil alkolu %50-100 konsantrasyonunda denemişler, en yüksek verimi %90'lık etil alkolle elde etmişlerdir. Ekstraksiyon tekniklerinden en etkilisinin ultrason destekli ekstraksiyon olduğunu (12.59 mg/g), onu 24 saat karıştırarak ekstraksiyon (8.60 mg/g), 6 saat geri soğutucuyla (8.03 mg/g) ve 24 saat süreyle maserasyon (3.33 mg/g) tekniğinin olduğunu saptamışlardır. Optimum ekstraksiyon koşulları olarak %90 etil alkolle, sıvı:kıta oranı 20:1 ve 40 °C'de 50 dakika 150 W'da ultrason destekli ekstraksiyon olduğunu bildirmişlerdir.

Geană ve diğ. (2014), 4 elma çeşidinden etanol kullanarak 2 farklı yöntemle ursolik ve oleanolik asit elde etmişlerdir. Çeşide bağılı olarak elma kabuklarının ursolik asit içeriğini 398.50 mg/g ile 541.91 mg/g arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Elma pulplarından ursolik asit eldesinde sokselet ve subkritik akışkan yöntemlerini kullanmışlardır. Sokselet ekstraksiyonla daha yüksek verim elde etmişlerdir.

Vetal ve diğ. (2014), *Ocimum sanctum* yapraklarından ursolik ve oleanolik asiti ayırmada ultrason ile birlikte üç faz ayırma tekniğini kullanmışlardır. Optimum terpenik asit ekstraksiyonu için süreyi 120 dakika, pH'yı 7, amonyum sülfat doygunluğunu %50, ham ekstrakt:t-bütanol oranını 1:1, besleme yükünü %7.5 koşullarında elde etmişlerdir. Bu koşullarda verimi ursolik asit için % 79.48, oleanolik asit verimi için % 80.67 olarak

hesaplamışlardır. Bu tekniği ultrason ile birleştirip süreyi 120 dakika yerine 14 dakika olarak aldıklarında verim, ursolik asit için % 83.36, oleanolik asit için % 85.58 olmuştur. Klasik solvent ekstraksiyonda ursolik ve oleanolik asit için verimi sırasıyla % 56.1 ve % 60.32 olarak belirlemişlerdir.

Wei ve Yang (2014), hepatit, tonsilit, boğaz ağrısı, apendisit gibi hastalıklar ile karaciğer, akciğer ve mide tümörlerine karşı halk hekimliğinde kullanılan *Hedyotis diffusa* Willd. (sinonimi, *Oldenlandia diffusa* Willd.; familyası Rubiaceae) bitkisinden oleanolik ve ursolik asit ekstraksiyonunda ultrason destekli ekstraksiyon ile geri soğutucuyla ekstraksiyon modifikasyonunu kullanmışlardır. Bu modifiye tekniğin daha düşük sıcaklıkta daha az solventle çalışma imkanı sağladığı ve hızlı ekstraksiyonun mümkün olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu tekniği tek tek ultrason destekli ekstraksiyon ve geri soğutucuyla ekstraksiyonla karşılaştırdığında %12 daha fazla verim elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Bu teknik kullanarak yaptıkları ekstraksiyonda ursolik asit içeriğini en yüksek %90 etanol (3.030 mg/g) ve kloroform (3.006 mg/g) ile ekstrakte ettiklerinde elde etmişlerdir. Ultrason destekli ekstraksiyonda en yüksek ursolik asit verimini % 80'lik etanolle (2.966 mg/g) gerçekleştirmişlerdir.

Zhang ve diğ. (2014), bazı meyvelerin kabuk ve meyve etinde terpenik asitleri belirlemişlerdir. Ursolik asidi, elma kabuklarında 60.3 mg/kg, armut kabuğunda 358.4 mg/kg, Trabzon hurması kabuğunda 879.7 mg/kg, meyve etinde 25.8 mg/kg olarak saptamışlardır. Trabzon hurması kabuğunun yüksek tannik asit içeriğinden dolayı tüketiminin zor olduğunu bu nedenle terpenoik asitlerin ekstrakte edilip sonra tüketilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Hedayati ve diğ. (2015), HPLC ile *Salvia sahendica* Boiss. Buhse (Lamiaceae) bitkisinde ursolik asit ve oleanolik asit miktarlarını sırasıyla 112.92 mg/100 g ve 645.93 mg/100 g olarak bulmuşlardır.

Wei ve Yang (2015), Çin'de sağlık amacıyla tüketilen çayların başında gelen *Hedyotis diffusa* ve *Hedyotis corymbosa*'dan ultrason destekli süperkritik akışkan CO₂ (USC-CO₂) yardımıyla ursolik ve oleanolik asit ekstrakte etmişlerdir. USC-CO₂ tekniğinin alışılmış SC-CO₂ ve solvent ekstraksiyon metotlarına göre daha az solvent ve süre gerektirdiğini ve verimin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. USC-CO₂ ekstraksiyon kinetiğinin 2. dereceden reaksiyon olduğunu saptamışlardır. Oleanolik ve ursolik asidin aktivasyon enerjisini sırasıyla 6.784 ve 4.981 kJ/mol olarak hesaplamışlardır. *H. diffusa*'dan bu iki terpenik asidi ekstrakte etmede kloroform, diklorometan, etil asetat, metanol, metil isobütil

keton, n-hekzan, su, etanol (%10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 95 konsantrasyonunda) ve saf süperkritik akışkan-CO₂ kullanmışlardır. Bu çözücülerden n-hekzan, su, % 10, 20, 30, 40 ve 50 konsantrasyonlarında etanol ve saf süperkritik akışkan-CO₂ kullanarak elde ettikleri ekstraktlarda ursolik ve oleanolik asit belirleyememişlerdir. En yüksek ursolik asit içeriğini, kloroform ve % 90'lık etanol konsantrasyonu ile özütlediklerinde saptamışlardır.

Yang ve Wei (2015), Çin'de sağlık üzerine yararlı etkilerinden dolayı bitkisel çay olarak kullanılan *Rabdosia rubescens*'dan farklı ekstraksiyon teknikleriyle (geri soğutucuyla ve ultrason destekli ekstraksiyon) oleanolik asit, ursolik asit ve oridonin elde etmişlerdir. Ekstraksiyon etkinliğine etki eden faktörler ve aktivasyon enerjisi belirledikleri çalışmada, en yüksek verim 5 dakika 300 rpm çalkalamadan sonra uygulanan ultrason destekli ekstraksiyonla saptamışlardır. Optimum şartlarda ultrason destekli ekstraksiyonla 2.05 mg/g ursolik asit, 0.54 mg/g oleanolik asit ve 7.95 mg/g oridonin elde etmişlerdir.

Zheng ve diğ. (2015), yenedünya çiçeği çayında yaptıkları çalışmada, farklı kurutma teknikleri ile yenedünya çayının içerdiği toplam polifenol, toplam flavanoid, serbest amino asitler ve saponin grubu olan triterpenlerin miktarlarını hesaplamışlardır. Yeni dünya çiçeklerinde ana iki triterpenoit ursolik asit ve oleanolik asit olduğunu bildirmiş analizi HPLC cihazı ile yapmıştır. Bu çiçeklerde toplam ursolik asit miktarını % 0.35 civarında bulmuştur

Bernatoniene ve diğ. (2016), biberiye yapraklarından farklı ekstraksiyon teknikleri (maserasyon, perkolasyon, ultrason destekli ekstraksiyon, iki sulu faz ekstraksiyon) ile ursolik, oleanolik ve rosmarinik asit eldesi için optimum koşulları araştırmışlardır. Ursolik ve oleanolik asidin organik çözücülerde eriyebilirliğinin yüksek olduğunu belirleyerek %90 etanol konsantrasyonunda en yüksek verime ulaşmışlardır. Özellikle ekstraksiyon sıcaklığının artışı solventin hücrelere difüzyonunu artırdığını, hücrelerdeki bileşiklerin eriyebilirliği ve desorbsiyonunu zenginleştirdiğini bildirmişlerdir. En yüksek ursolik asit verimini katı/sıvı oranı 1:15, ekstraksiyon sıcaklığı 60°C, ekstraksiyon süresi 10 dakika %90 etanolla ultrason destekli ekstraksiyondan elde edilen özütlerde belirlemişlerdir. Optimum koşullarda ursolik asidi 15.8 mg/g olarak saptamışlardır.

Cardozo ve diğ. (2016), mate çayında (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) farklı üretim tekniklerine maruz bırakılmış ürünlerdeki ortalama ursolik asit içeriğini belirlemişlerdir. Ortalama 100 g kurutulmuş mate çayında 0.003 ila 0.234 g ursolik asit olduğunu belirtmişlerdir.

Morrison ve diğ. (2016), Kanadalı yerliler tarafından bir çok hastalığın tedavisinde kullanılan mor sūrahi bitkisinde yaptıkları çalışmada, metanol su karışımı ile örneklerini ekstrakte etmişler ve LC-MS cihazında bir saponin türevi olan ursolik asit miktarını kuru maddede ortalama % 0.02 olarak tespit etmişlerdir.

Pai ve Joshi (-), *Ocimum basilicum*, *O. gratissimum*, *O. kilimandscharicum*, *O. tenuiflorum*'un yaprak, gövde ve çiçeklerinin ursolik asit, betulinik asit ve oleanolik asit içeriklerini HPLC ve ince tabaka kromatografiyle belirlemişlerdir. En yüksek ursolik asit içeriği; *O. gratissimum*'un yapraklarında (% 0.296) bulunmuş, onu *O.kilimandscharicum*'un çiçekleri (%0.170), *O. gratissimum*'un çiçekleri (%0.152), *O.gratissimum*'un gövdesi (% 0.137) ve *O.basilicum*'un çiçekleri (% 0.086) izlemiştir.

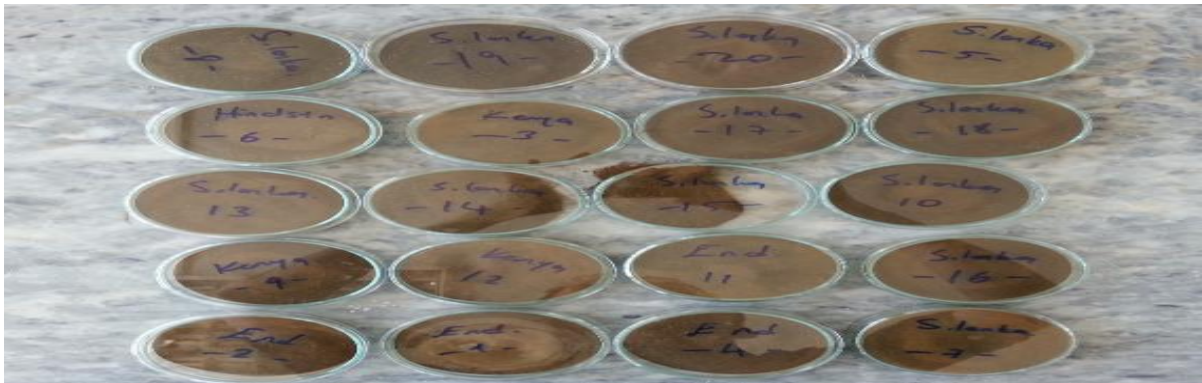
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Çalışmanın materyalini yerli ve yabancı menşeli siyah çay, yabancı menşeli yeşil çay ve 1. ve 2. sürgün döneminde Çay Fabrikası'nda (Doğuş, Rize) üretilen siyah çaylar oluşturmaktadır. Çalışmada, 19 yerli ve yabancı siyah çayla 19 adet yeşil çay (Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3) analiz edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan yerli siyah çay numuneleri



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan ithal siyah çay numuneleri



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan ithal yeşil çay numuneleri



Şekil 3.4. Kampanya süresince alınan siyah çay numuneleri

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kuru madde tayini

Darası alınmış nikel kaplara 5 g çay örnekleri tartılarak etüvde 103 ± 2 °C’de sabit ağırlığa ulaşincaya kadar tutulmuş ve oluşan ağırlık kaybından % kuru madde miktarı hesaplanmıştır (AOAC, 2000).

Çözücü seçimi

Triterpenik asit ekstraksiyonu çalışmalarında, en verimli çözücülerden biri metanoldur. Bu nedenle, çalışmada toksisitesi bilinmesine rağmen çözücü olarak metanol ve bunun yanı sıra

etanol ve su kullanılmıştır. Ön deneme sonucunda verimin yüksek olduğu çözücüyle asıl çalışma gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Triterpenik asitlerin ekstraksiyonu

Çalışmada, yüksek verim sağlaması ve ekstraksiyon süresinin kısa olması nedeniyle ultrason destekli ekstraksiyon tekniği kullanılmıştır. Terpenik asitlerden ursolik ve oleanolik asit eldesinde bu teknik yaygın şekilde kullanılmaktadır (Lee ve diğ., 2009; Tian ve diğ., 2010; Xia ve diğ., 2012; Vatel ve diğ., 2013; Fu ve diğ., 2014; Wei ve Yang, 2014; Yang ve Wei, 2015; Bernatoniene ve diğ., 2016).

Ultrason destekli ekstraksiyon laboratuvar ölçekli ultrasonik banyoda (WUCA06H WiseClean Ultrasonic Cleaner, DAIHAN Sciencetific Co., Ltd. Sungbuk-Gu, Korea, 6 L. 340 W)gerçekleştirilmiştir.

5 g çay örneği kapaklı cam kaplara tartılmış, üzerine 100 mL metanol eklenip ultrasonik banyoda $48 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 120 dakika bekletilip soğutulup filtre edilmiştir.

3.2.3. Triterpenik asit tayini

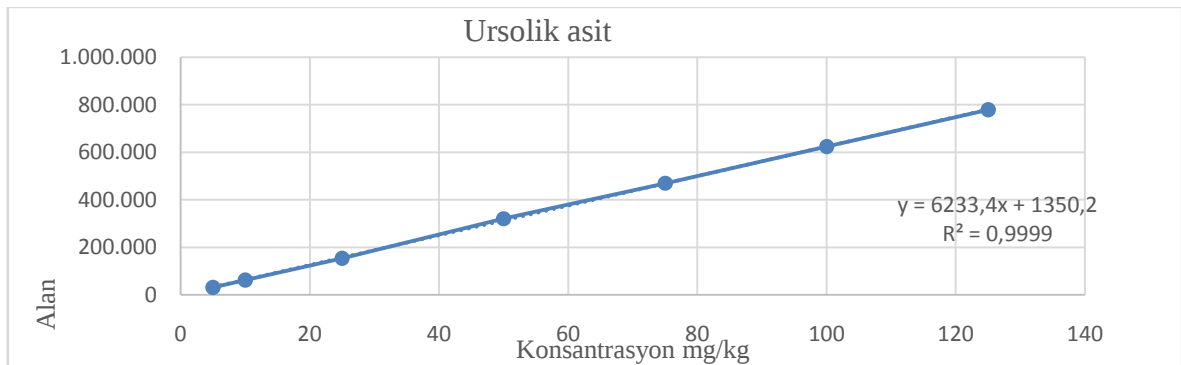
Triterpenik asit içeriğinin belirlenmesinde Perkin Elmer firması tarafından üretilmiş Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.5). Bu cihaz; Series 200 pompa, Series 200 autosampler, Series 200 kolon fırını, Series 200 UV-VIS detektör ve NCI İnterface ünitesinden oluşmaktadır. Kolon olarak, Intersil ODS-4 5 μm C18 (150 x 4.6 mm) kullanılmıştır. HPLC ile ursolik asidin saptanmasında Taralkar ve Chattopadhyay (2012)'in bildirdiği yöntem kullanılmıştır. Çalışmada mobil faz olarak, asetonitril:metanol karışımı (80:20) kullanılmış, analiz şartları 0.5 ml/dak akış hızı, 35 °C kolon sıcaklığı olarak ayarlanmıştır. Ölçümler 210 nm dalga boyunda yapılmıştır. Ursolik asit ve oleanolik asitin alıkonma süresi ortalama 9.32 dakikada tespit edilmiştir.



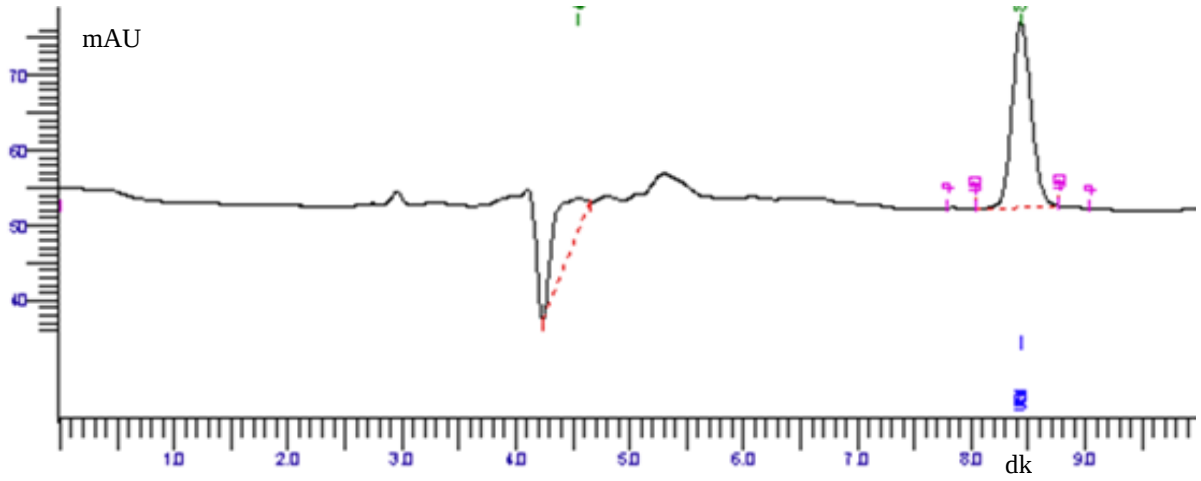
Şekil 3.5. Çalışmada kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı

3.2.3.1. Ursolik asit çözeltilerinin hazırlanması

1000 ppm’lik ursolik asit stok çözeltisi metanolle hazırlanmış, bundan 5, 10, 25, 50, 75, 100 ve 125 ppm’lik standart ursolik asit çözeltileri elde edilmiştir. Standart çözeltiler, 0.45 µ teflon filtreden geçirilip HPLC’ye enjekte edilmiştir. Standart konsantrasyonuna karşılık gelen alıkonma süresi ve pik alanı kaydedilmiştir. Her bir standart çözelti için kaydedilen alan değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 3.6). Ursolik asitin ortalama alıkonma zamanı 8.72 dakika olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.7).



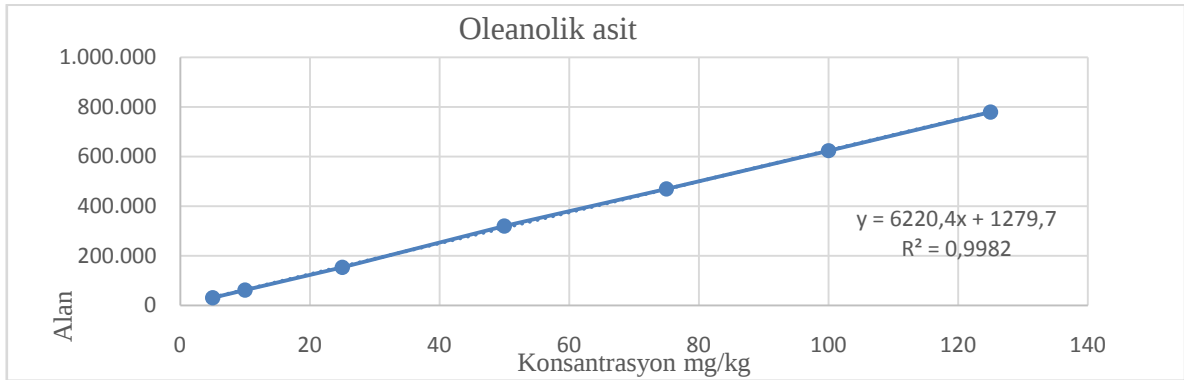
Şekil 3.6. Ursolik asite ait kalibrasyon grafiği



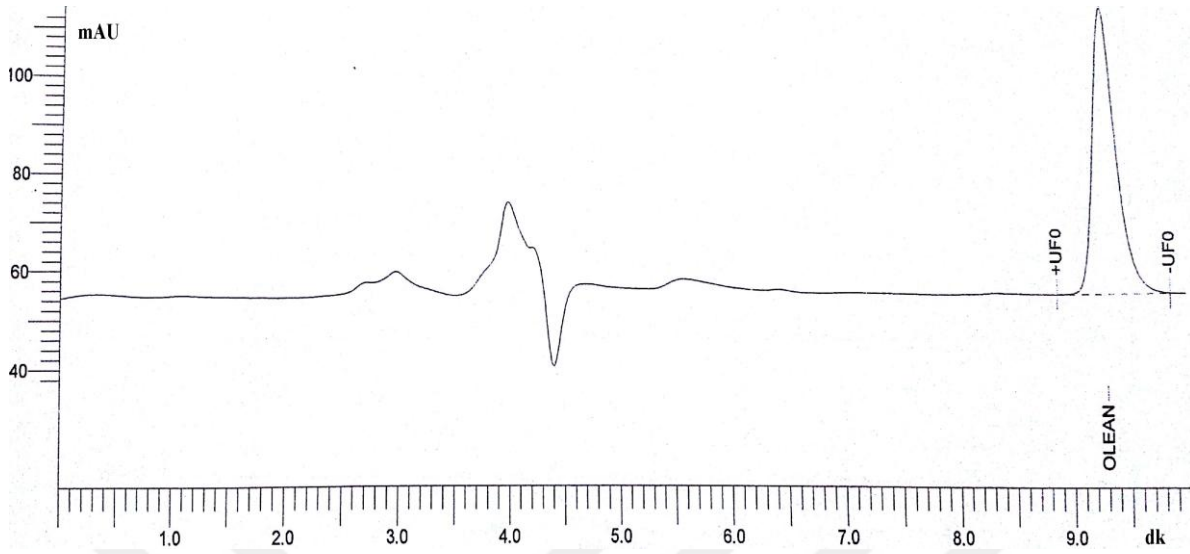
Şekil 3.7. Ursolik asit standardına ait kromatogram

3.2.3.2. Oleanolik asit çözeltilerinin hazırlanması

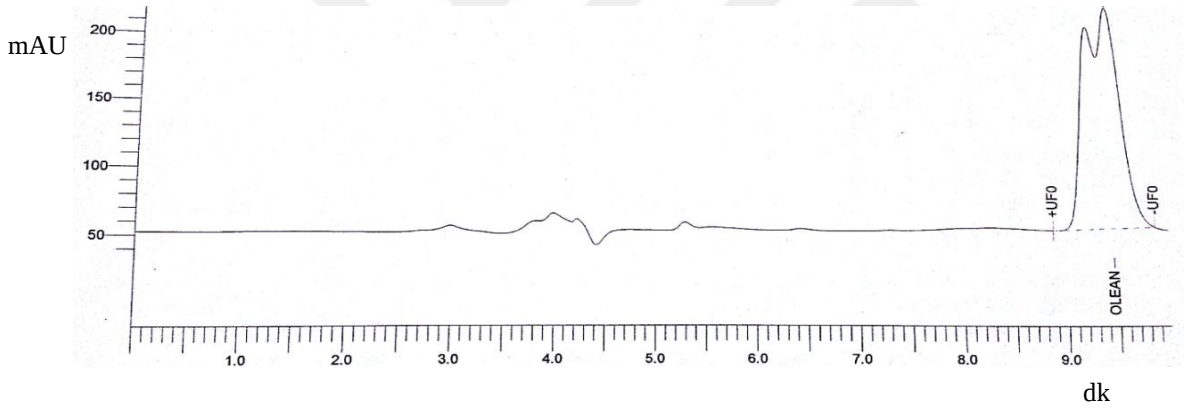
1000 ppm’lik oleanolik asit stok çözeltisi metanolle hazırlanmış, bundan 5, 10, 25, 50, 75, 100 ve 125 ppm’lik standart ursolik asit çözeltileri elde edilmiştir. Standart çözeltiler, 0.45 µ teflon filtreden geçirilip HPLC’ye enjekte edilmiştir. Standart konsantrasyonuna karşılık gelen alıkonma süresi ve pik alanı kaydedilmiştir. Her bir standart çözelti için kaydedilen alan değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 3.8). Oleanolik asitin ortalama alıkonma zamanı 9.30 dakika olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.8. Oleanolik asite ait kalibrasyon grafiği



Şekil 3.9. Oleanolik asit standardına ait kromatogram



Şekil 3.10. Oleanolik asit ve ursolik asit standardına ait kromatogram

Çalışmada bazı örneklerde ursolik ve oleanolik asitler ayrı ayrı tanımlanamadığı için sonuç ursolik aside göre toplam triterpenik asit olarak verimiştir.

3.3.İstatiksel Analizler

Verinin varyans analizine uygunluğunu değerlendirmek için öncelikle Kolmogorov-Smirnov tek örnek testi ile normal dağılış gösterip göstermediği incelenmiş olup verinin dağılışının normal sayılabileceği ($P=0.101$) anlaşılmıştır. Varyansların homojenliğini değerlendirmek için Levene testi yapılmış olup varyansların homojen olmadığı ($P<0.001$) belirlenmiştir. Elde edilen bulgular ursolik asit verilerinin varyans analizi ile değerlendirilemeyeceğini ortaya koymuştur. Bu durumda nonparametrik yöntemlerden en güvenilirlerinden biri olan permütasyon testleri (Önder, 2007) kullanılarak veriler analiz edilmiştir. Ortalamaların

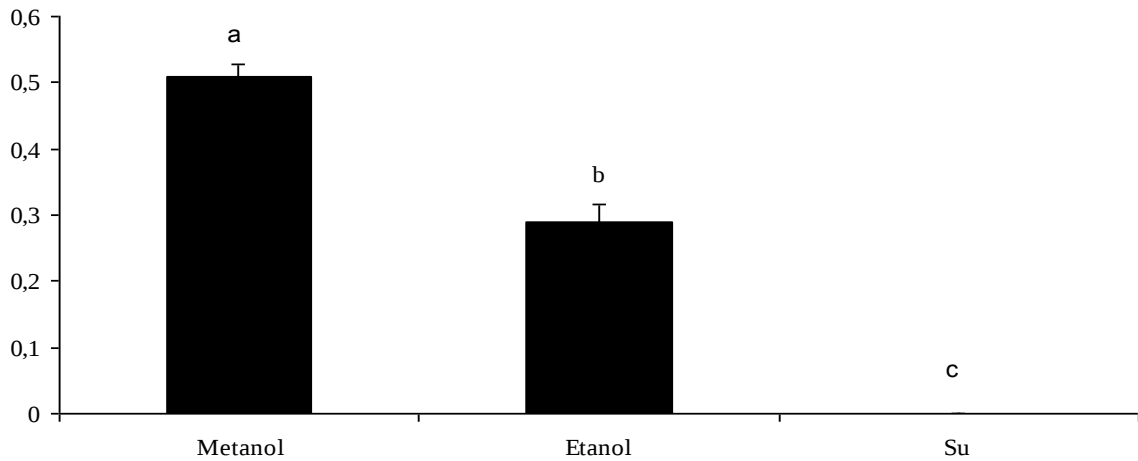
karşılaştırılması için ikili permüyaston testleri yapılmış olup, verilerin analizinde NPMANOVA (Anderson, 2000) yazılımı kullanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Çözücü Seçimi

Günümüze kadar, bitkisel kaynaklardan terpenik asitlerin ekstraksiyonunda yaygın olarak metanol, etanol ve bunların suyla karışımları kullanılmıştır. Bu çalışmada, 3 çözücüyle ön çalışma yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1. Farklı çözücülerle ekstrakte edilen örneklerin triterpenik asit içeriği

Şekilden de görüldüğü gibi, çalışma sonucunda siyah çaydan triterpenik asit eldesinde en iyi çözücü metanoldur. Farklı çözücülerle yapılan ekstraksiyon işleminde çözücülerin etkisi istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuçlar, literatürde bazı araştırmacıların (Janicsák ve diğ., 2003; Tarvainen ve diğ., 2010; Xia ve diğ., 2012; Vetel ve diğ., 2012) bildirdiklerine paraleldir. Lamiaceae familyasına ait bazı bitkilerin ursolik ve oleanolik asit içeriğini araştıran Janicsák ve diğ. (2003) çalışmalarında, metanol, aseton, benzen, etil asetat ve %70’lik etil alkol kullanmışlar ve en etkili çözücünün metanol olduğunu saptamışlardır. Tarvainen ve diğ. (2010), sinir otunun yapraklarından ursolik asit ve oleanolik asit ekstraksiyonunda çözücü olarak dietil eter, metanol, etanol ve %70’lik etanol kullanmışlar ve en yüksek verimi metanol ve dietil eterle bulmuşlardır. *Lamii albi* flosbitkisinden farklı

tekniklerle ursolik asit ekstrakte eden Wójciak-Kosior ve diğ. (2013), çözücü olarak metanol, aseton ve etil asetat kullanmış, en etkili çözücünün metil alkol olduğunu saptamışlardır. *Ocimum sanctum* yapraklarından ursolik asit ekstraksiyon kinetiği ve optimizasyonu üzerine çalışan Vetel ve diğ. (2012), çözücü olarak metanol, aseton, asetonitril ve etil asetatı denemişler, en yüksek verimi metil alkolle elde etmişlerdir.

Bu çalışmada, çaydaki terpenik asitlerin suya geçmediği gözlenmiştir. Bu durum daha önce farklı ekstraksiyon teknikleriyle *Hedyotis diffusa* Willd.'dan ursolik ve oleanolik asit ekstrakte eden Wei ve Yang (2014) ile *Hedyotis diffusa* ve *Hedyotis corymbosa*'dan ultrason destekli süperkritik akışkan CO₂(USC-CO₂) yardımıyla ursolik ve oleanolik asit ekstrakte eden Weive Yang (2015) tarafından da bildirilmiştir.

4.2. Siyah Çayın Triterpenik Asit İçeriği

Bu çalışmada, ülkemizde üretilen siyah çayların triterpenik asit içeriği belirlenmiştir. Bunun için 2014 yılında Rize'de üretim yapan özel ve çaykur'a ait siyah çaylar satış noktalarından sağlanmıştır. Yerli siyah çayların genel profilini ithal çaylarla karşılaştırmak için gümrük yoluyla gelen siyah çaylardan numune alınmıştır. Ayrıca, siyah çayla yeşil çay arasında farklılık olup olmadığını belirlemek için ithal yeşil çayların triterpenik asit içerikleri incelenmiştir. Ülkemizde yeşil çay üreten fabrikaların sayısının az olması nedeniyle analiz edilmesine rağmen istatistiksel olarak karşılaştırmada kullanılamadığı için yerli yeşil çayların sonuçlarına yer verilmemiştir. Yerli ve ithal siyah çaylarla yeşil çaylara ait HPLC kromatogramları EKLER'de, analiz sonuçları ise Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'te görülmektedir. Ülkemizde üretilen siyah çayların triterpenik asit içeriği kuru maddede % 0.38 ile % 0.67 arasında değişmiştir. İthal siyah çayların %0.11 ile %0.26 arasında değişmiştir. Bu değerler yerli siyah çaylarda bulduklarımızdan daha düşüktür. İthal yeşil çayların %0.21 ile %0.99 (ortalama % 0.51) arasında değişmiştir. Yerli siyah çaylar ithal yeşil çayların triterpenik asit içeriğine yakındır.

Çizelge 4.1.Yerli siyah çayların triterpenik asit içeriği

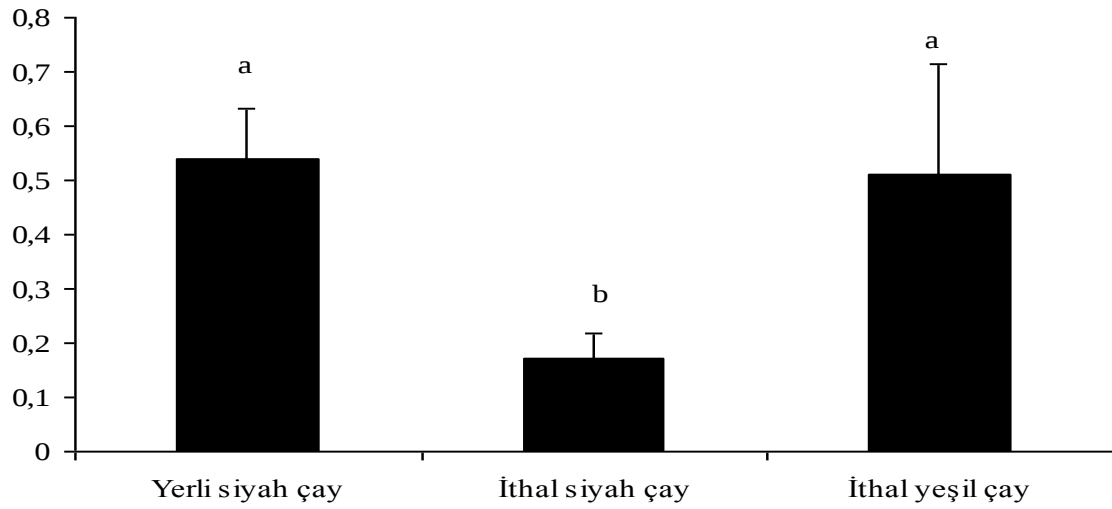
Örnek No	Kuru madde (%)	Triterpenik asit (%)
1	95.21	0.67
2	96.72	0.39
3	94.13	0.40
4	95.75	0.44
5	95.00	0.52
6	97.12	0.54
7	96.15	0.55
8	98.70	0.62
9	98.42	0.38
10	96.15	0.56
11	98.00	0.42
12	96.51	0.57
13	93.50	0.61
14	97.91	0.65
15	94.71	0.54
16	95.03	0.55
17	96.11	0.52
18	95.18	0.61
19	98.88	0.67

Çizelge 4.2.İthal siyah çayların triterpenik asit içeriği

	Menşei	Kuru madde, %	Triterpenik asit, %
Örnek No			
1	Endonezya	93.56	0.24
2	Endonezya	92.12	0.25
3	Endonezya	96.23	0.26
4	Endonezya	94.00	0.19
5	Endonezya	95.23	0.16
6	Sri Lanka	93.70	0.21
7	Sri Lanka	95.60	0.16
8	Sri Lanka	97.10	0.21
9	Sri Lanka	93.60	0.22
10	Sri Lanka	95.23	0.11
11	Sri Lanka	98.13	0.13
12	Sri Lanka	93.24	0.19
13	Sri Lanka	96.23	0.15
14	Sri Lanka	95.60	0.12
15	Sri Lanka	97.50	0.18
16	Sri Lanka	94.40	0.18
17	Hindistan	93.12	0.12
18	Kenya	95.13	0.11
19	Kenya	94.70	0.14

Çizelge 4.3.İthal yeşil çayların triterpenik asit içeriği

Örnek No	İthal edilen ülke	Kuru madde, %	Triterpenik asit, %
1	Çin	95.14	0.38
2	Çin	94.37	0.67
3	Çin	96.81	0.46
4	Çin	95.4	0.55
5	Çin	96.13	0.51
6	Endonezya	97.21	0.25
7	Endonezya	98.01	0.25
8	Endonezya	96.51	0.7
9	Endonezya	98.01	0.43
10	Endonezya	97.1	0.45
11	Hindistan	95.81	0.76
12	Hindistan	96.15	0.21
13	Hindistan	98.1	0.48
14	Hindistan	93.38	0.53
15	Hindistan	97.51	0.71
16	Japonya	98.01	0.67
17	Japonya	94.15	0.24
18	Japonya	96.81	0.48
19	Japonya	97.88	0.99



Şekil 4.2. Analizi yapılan çayların triterpenik asit içeriğinin karşılaştırılması

Şekilden de görüldüğü gibi yerli siyah çayların triterpenik asit içeriği ithal çaylardan oldukça yüksek ve istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($p<0.05$). Ancak yerli siyah çaylarla yabancı menşeli yeşil çayların triterpenik asit değerleri arasında fark yoktur ($p>0.05$).

Bu çalışmada, farmakolojik açıdan faydalı bir bileşik olan triterpenik asitlerden ursolik asit ve oleanolik asitin ülkemizde fazlaca tüketilen *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze bitkisinin taze sürgün yapraklarından farklı tekniklerle üretilen siyah ve yeşil çaylardaki miktarları incelenmiştir. Yerli siyah çaylarla ithal siyah çayların toplam ursolik asit ve triterpenik asit miktarları karşılaştırıldığında; yerli siyah çaylarda % 0.53 gibi bir değer bulunurken ithal siyah çayların toplam ursolik asit ve oleanolik asit içerikleri % 0.15 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlardaki farklılığın iklim ve yetiştirilme koşullarına, çay yapraklarından siyah çay ürünlerini elde etmek için kullanılan proseslere, kültürel etmenlere bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir.

Rize iline ithal yollarla gelen yeşil çayların triterpenik asit içerikleri ortalama % 0.51 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç değerlendirildiğinde, yeşil çaylardaki triterpenik asit miktarı yerli siyah çayların toplam ursolik asit ve oleanolik asit miktarına yakın, ithal ve sürgün dönemi siyah çaylarda bulunan triterpenik asit miktarına göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Sonuç olarak yeşil çaydaki triterpenik asitlerden olan ursolik asit ve oleanolik asit miktarının yüksek olması yeşil çayın üretim tekniği ve prosesindeki farklılıklar ayrıca iklim, yetiştirilme ve hasat etkenlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Genel olarak çay bitkisinin toplam triterpenik asit içeriklerinin ursolik asit ve oleanolik asit cinsinden tespiti ile ilgili literatürde örnek bulunmamaktadır, ancak bu konu ile ilgili birçok bitki ve meyvede yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle elde edilen sonuçlar, çeşitli bitki ve meyvelerdeki bulgularla karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Lamiaceae familyasına ait 5 medikal bitkinin ursolik ve oleanolik asit içeriği üzerinde çalışan Janicsák ve diğ. (2003)'in bulgularıyla karşılaştırıldığında, *Salvia officinalis* L., *Melissa officinalis* L. türlerinin ursolik asit ve oleanolik asit içeriklerinin bizim çayda bulduğumuz değerlerden oldukça fazla, *Satureja montana* L., *Hyssopus officinalis* L. türlerinin sonuçlarıyla uyumlu, *Marrubium vulgare* L. türünün sonuçlarından ise daha yüksek olduğu görülmüştür. Lamiaceae familyasına ait bitkilerde çalışan Janicsák ve diğ. (2006)'nin *Salvia lavandulifolia* Vahl. (% 4.019), *Salvia*

officinalis L. (%3.825) ve *Nepeta x faassenii* Berg. (%2.923) bitkilerinde buldukları değerler ise bizim sonuçlarımızdan yüksektir. Kowalski ve diğ. (2007)'nin *Silphium integrifolium* ve *Silphium trifoliatum* türlerinde belirlediği toplam triterpenik asit miktarından (ortalama % 1.49 ve %1.55) analizi yapılan tüm siyah ve yeşil çay örneklerinin sonuçları çok daha düşük olduğu görülmüştür. Farklı gelişme zamanlarında yeni dünya meyvesinin çiçeklerinde çalışan Zhou ve diğ. (2007) ursolik asiti %0.215-0.268 ve oleanolik asidi % 0.038-0.051 aralığında belirlemişlerdir. Bu değerler, farklı sürgün döneminde üretilen çaylarla ithal siyah çayların triterpenik asit içeriklerinden yüksek, fakat yerli siyah çaylar ve ithal yeşil çay örneklerinin triterpenik asit içeriklerinden daha düşüktür. Bizim tüm çaylarda bulduğumuz değerler ayı üzümü, kahve, okalüptüs, melisa otu, zakkum, mercanköşk, kekik, biberiye, adaçayı, mürver yemişi, geyik otu ve kekik yaprakları ile alıç çiçek ve yaprakları, lavanta çiçek ve yaprakları, elma kabukları ve elma pulpu gibi bitkisel çaylarda çalışan Jäger ve diğ. (2009)'in bulgularından daha düşüktür. Aynı araştırmacıların kızılcık, zeytin yaprakları ile armut kabuklarında buldukları değerlerden daha yüksektir. Fang ve diğ. (2010), *Chaenomeles sinensis* meyvesinin triterpenik asit miktarını %1.126 olarak belirlemişlerdir. Bu miktar, çalışmada tespit edilen tüm çay örneklerinin değerlerinden oldukça fazladır. Tarvainen ve diğ. (2010), sinir otunun yapraklarında elde ettikleri triterpenik asit miktarı, bu çalışmada tespit edilen kampanya dönemi ve ithal siyah çaylarının sonuçlarına yakın, ancak yerli siyah çaylar ve ithal yeşil çaylarına ait değerlerden daha düşüktür. Bu bitkinin tohumlarında buldukları ursolik asit ve oleanolik asit miktarları ise çay örneklerinin değerlerinden oldukça düşüktür. Başka bir çalışmada, Yang ve diğ. (2010), tarafından farklı tür ve orijinli Kuding çaylarında ursolik asit ve oleanolik asit içeriği tespit edilmiştir. Araştırmacıların bulguları bu çalışmada elde edilen sonuçlarla kıyasladığında çay örneklerinin daha düşük triterpenik asit içerdiği görülmüştür.

Trabzon hurması çeşitlerinin ursolik ve oleanolik asit içerikleri üzerine çalışan Zhou ve diğ. (2010)'nin sonuçları, bizim çay örneklerimizde bulunduklarımızın oldukça altındadır. Gotti (2011), kızılcığın ursolik asit içeriğini % 0.03, oleanolik asit içeriğini ise % 0.01 olarak tespit etmiştir. Bu değerler, bizim sonuçlarımıza göre genel olarak daha düşüktür. Vaccinium tür ve ürünlerinde çalışan Kondo ve diğ. (2011)'in bu meyvelerde tespit ettikleri ursolik asit miktarları bizim yaptığımız çalışmada elde edilenlerden düşüktür.

Tüm çay örneklerinin triterpenik asit içeriği, Li ve diğ. (2011)'nin narın meyve, kabuk ve çekirdeğinde, limonun meyve et ve kabuğunda, mandalınanın kabuğunda, Çin alıcının meyve

eti ve çekirdeğinde; hünnapın meyve eti ve kivide belirledikleri ursolik asit miktarının çok üzerindedir. Çay örneklerinin triterpenik asit içeriği Xia ve diğ. (2011) tarafından *ligustrum lucidum* meyvesinde belirlenen değerden daha fazladır. Farklı armut çeşitlerinin fenolik bileşik ve triterponoidlerini araştıran Li ve diğ. (2012), çalışmalarında belirledikleri triterpenik asit miktarı bizim çay örneklerinde tespit ettiğimiz miktarlardan daha düşük olduğu görülmektedir. *Ligustrum lucidum* Ait meyvesinde ursolik asit ve oleanolik asit belirleyen Xia ve diğ. (2012)'in elde ettikleri sonuçların çayda sürgün dönemi, ithal siyah çay örnekleri, yerli siyah çay örnekleri ve ithal yeşil çay örneklerinden elde edilen ursolik asit ve oleanolik asit miktarlarından oldukça düşük olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada Xu ve diğ. (2012)'nin yeni dünya yapraklarında belirledikleri ursolik asit ve oleanolik asit içerikleri tüm çay örneklerinden daha düşüktür. *Plumeria obtusa* bitkisinde çalışan Gambhava ve diğ. (2013)'in triterpenik asitler olan ursolik asit ve oleanolik asit sonuçlarıyla (ortalama % 0.197) karşılaştırıldığında, 2. kampanya döneminde ve ithal siyah çay numunelerinde bulduğumuz değerlere yakındır.

Yang ve diğ. (2013), *Scutellaria barbata* D. Don bitkisinde ursolik asit ve oleanolik asit miktarlarını farklı ekstraksiyon teknikler kullanarak tespit etmişler ve sırasıyla birinci grup çalışmada oleanolik asit verimini kurumaddede % 0.0014 ve ursolik asit verimini kurumaddede % 0.0059 olarak bulmuşlardır. İkinci grup ekstraksiyonda oleanolik asit verimini kurumaddede %0.0013 ve ursolik asit verimini kurumaddede % 0.0057 olarak bulunmuştur. Yine bu veriler ile çay örneklerinin toplam ursolik asit ve oleanolik asit miktarları karşılaştırıldığında, çay örneklerinin oldukça zengin triterpenik asit kaynakları olduğu ortaya çıkmaktadır. Farklı kurutulmuş meyvelerde çalışan Zhang ve diğ. (2013)'nin belirlediği ursolik ve oleanolik asit içeriği bizim sonuçlarla karşılaştırıldığında; çayın turna yemişi ve trabzon hurmasından daha zengin bir triterpenik asit kaynağı olduğu görülmektedir. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) Paraguay çayında çalışan Bravo ve diğ. (2014) ile yenedünya çiçeği çayında çalışan Zheng ve diğ. (2015)'in sonuçları (toplam ursolik asit ve oleanolik asit olarak) 1. ve 2. kampanya dönemi siyah çaylarla ve ithal siyah çayların değerlerinden yüksek, ancak yerli siyah çay ve ithal yeşil çay örneklerinin değerlerinden daha düşüktür. Geană ve diğ. (2014), 4 farklı elma çeşidinden ursolik ve oleanolik asit miktarlarını belirlemişlerdir. Araştırmacıların bulgularıyla bizim sonuçlar karşılaştırıldığında; çay örneklerinin triterpenik asit içeriğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yine, çay örneklerinin

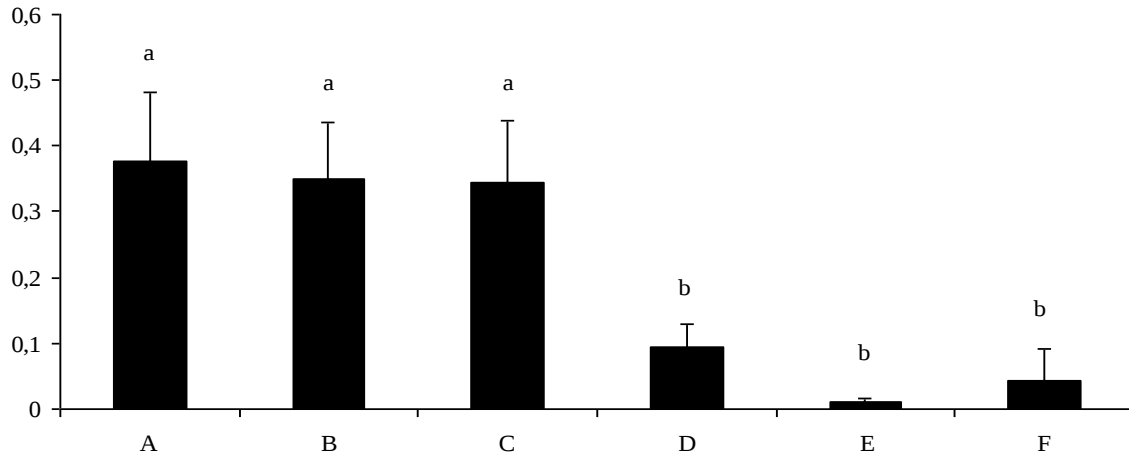
triterpenik asit içeriği *Hedyotis diffusa* Willd. bitkisinde çalışan Wei ve Yang (2014)'in belirlediklerinin daha üzerindedir.

Triterpenik asit olan ursolik asit ve oleanolik asitin bitkilerin farklı kısımlarında farklı miktarlarda bulunduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Zhang ve diğ. (2014), bazı meyvelerin kabuk ve meyve etinde bu terpenik asitleri belirlemişlerdir. Çalışmalarında elma, armut, Trabzon hurması kabuğu kullanmışlar ve tespit ettikleri sonuçların analizi yapılan sürgün dönemi, ithal, yerli siyah ve ithal yeşil çayların sahip olduğu ursolik asit ve oleanolik asit değerlerinden düşük olduğu görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada analiz edilen çaylar elma, armut, Trabzon hurması kabuğundan daha zengin bir triterpenik asit içeriğine sahiptir.

Yang ve Wei (2015), bitkisel çay olarak kullanılan *Rabdosia rubescens*'dan oleanolik asit ve ursolik asit elde etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçların ursolik asit ve oleanolik asit içerikleri çay örneklerinden oldukça düşük çıkmıştır. Biberiyede çalışan Bernatoniene ve diğ. (2016)'in tespit ettikleri ursolik asit içeriği bizim bulgularımızdan daha yüksektir. Mate çayında (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) çalışan Cardozo ve diğ. (2016) ursolik asiti 0.003 g/100g ile 0.234 g/100g olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, bizim bulgularımızdan daha yüksektir.

4.3. Farklı Kampanya Döneminde İşlenen Siyah Çayların Triterpenik Asit İçeriği

Bu çalışmada, siyah çayın triterpenik asit içeriğinin belirlenmesi dışında işleme süresince değişimini de incelemek hedeflenmiştir. Bunun için siyah çay işleyen bir çay fabrikasından farklı kampanya dönemi içerisinde siyah çaylar alınıp analiz edilmiştir. Analizler 1. ve 2. kampanya döneminde baş, orta ve son dönem olacak şekilde tekrar edilmiştir. Örnek alınan fabrikada çaylar 3 sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar kalitesiz, orta kalite ve kaliteli çaylar olmak üzere. Çalışmada her 3 çay tipinin eşit miktarı paçallanıp analiz edilmiştir. Bu çaylara ait HPLC kromatogramları EK D'de verilmiştir. Sonuçlar ise Şekil 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.3.Farklı Sürgün döneminde siyah çayların triterpenoik asit içeriği (A, B, C: 1. sürgün dönemi; D, E,F: 2. sürgün dönemi).

Farklı sürgün döneminde belli aralıklarla çay fabrikasından alınan örneklerde yapılan analizler sonunda, çayların triterpenik asit içeriğinin birbirinden oldukça farklı olduğu, bu farklılığın istatistiki açıdan önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür. Siyah çayların triterpenik asit içeriği, 1.sürgün döneminde % 0.27 ile % 0.48 arasında (ortalama % 0.356 ± 0.084), 2. sürgün döneminde ise % 0.01 ile % 0.13 (ortalama % 0.05 ± 0.047) arasında değişmiştir. Sürgün dönemi ilerledikçe çay örneklerinin triterpenik asit miktarında belirgin bir düşüş kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, taze sürgünlerden elde edilen ilk ürünlerin ursolik asit ve oleanolik asit bakımından daha zengin olduğunu, çay sezonunun sonuna doğru elde edilen ürünlerde ise kademeli olarak düştüğünü göstermektedir. Bu azalma eğiliminin, ilk sürgün dönemlerinden elde edilen çayların kar altında kalması yani kış ayını gören numuneler olmasının yanında iklim değiştikçe diğer sürgün döneminden elde edilen çayların ise gece gündüz sıcaklık farkı ve strese bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çay hasatı ülkemizde mayıs ayında başlayıp eylül sonuna kadar devam etmektedir, fakat iklimsel bazı değişiklikler tarımsal sorunlar ve bölgelerin coğrafik konumu dolayısıyla bazı yıllarda bu süreç uzayıp kısalma eğilimi gösterir. Bazı işletmeler ise ürün kalitesi ve pazarlama planları doğrultusunda farklı hasat zamanlarının kaliteli sürgünlerini işlemeyi tercih etmekte ve bu düşünce doğrultusunda ürün alımı yapmaktadır. 1. sürgün dönemi iklim ve sıcaklığa bağlı olarak genellikle Mayıs-Haziran aylarına, 2. sürgün dönemi ise temmuz aylarına denk gelmektedir. Gece-gündüz sıcaklık farkı, iklim, genetik, çay çeşidi, kültürel

faktörler, toprak özellikleri gibi birçok etmen çay yaprağının bileşimine etki etmektedir (Kacar, 2010). Triterpenik asitlerin miktarı da yetiştirme koşullarından etkilenmektedir.

3 *Silphium* türünün farklı vejetatif ve generatif organlarındaki ursolik ve oleanolik asit içeriğini araştıran Kowalski (2007) en yüksek triterpenik asit içeriğini Mayıs ayında belirlemişlerdir. 2 farklı yeni dünya çeşidininin farklı dokularında çalışan Zhou ve diğ. (2011), meyvenin gelişimi sırasında ursolik ve oleanolik asit içeriğinde önemli değişimler olduğunu kaydetmişlerdir. En yüksek terpenoid asit birikiminin Mayıs ayının ilk haftasında olduğunu saptamışlardır. Szakiel ve diğ. (2012), Finlandiya ve Polonya’da yetişen kekreyemiş (*Vaccinium vitis-idaea* L.) meyve ve yapraklarının triterpenoid kompozisyonun iklim ve zamana bağlı değişimini incelemişlerdir. Triterpenik asit içeriğinin Ağustos ayında Finlandiya’da yetişen meyve, genç yaprak ve yaşlı yapraklarda tespit ettikleri miktarlarla Polonya’da yetişen kekreyemiş meyve, genç yaprak ve yaşlı yapraktaki değerlerle benzer olduğunu, ancak Aralık ayında genç ve yaşlı yapraklarda triterpenoid profilinin değiştiğini ve miktarının neredeyse yarıya indiğini rapor etmişlerdir. İklim ve zamana bağlı bitkilerdeki bu değişimi onaylayan bu tür örnekler bizim çalışmanın sonuçlarına paralellik göstermektedir. *Plumeria rubra*’nın yapraklarının ursolik asit içeriğini 12 ay boyunca izleyen Silva ve diğ. (2013) de, en yüksek değerin Mayıs ve Haziran, en düşük Aralık, Ocak, Şubat ve Mart aylarında olduğunu kaydetmişlerdir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, sağlık açısından önemli bir bileşik olan ursolik asit ve izomerini kapsayan triterpenik asitlerin Ülkemizde fazla tüketilen *Camellia sinensis* (L.) bitkisinin taze sürgün yapraklarından farklı tekniklerle üretilen siyah çaylardaki varlığı araştırılmıştır. Ülkemizde üretilen siyah çayların triterpenik asit içeriği kuru maddede % 0.38-0.67, yabancı menşeli siyah çaylarda %0.11-0.26 arasında bulunmuştur. Yabancı menşeli yeşil çaylarda ise %0.21 ile %0.99 arasında saptanmıştır. Yerli siyah çayların triterpenik asit içeriği yabancı menşeli siyah çaylardan oldukça yüksek ve istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($p<0.05$). Bu farklılıkların çayların üretim teknikleri ve yetiştirilme koşulları ile farklı iklim koşullarında yetiştirmelerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada ayrıca 2 farklı sürgün döneminde üretilen siyah çayların triterpenik asit içeriği de belirlenmiştir. 1. Sürgün döneminde triterpenik asit içeriğinin 2. Sürgün döneminde üretilenlere göre oldukça yüksek ($p<0.05$) olduğu kaydedilmiştir. Sürgün döneminin sonlarına doğru çay örneklerinin triterpenik asit içeriklerinde önemli düşüş kaydedilmiştir.

Farklı sürgün döneminde üretilen siyah çaylarla yerli siyah çay ve yabancı menşeli siyah çayların triterpenik asit içerikleri karşılaştırıldığında; iki sürgün döneminde de triterpenik asit içeriğinin daha düşük olduğu görülmüştür. Yine, farklı sürgün dönemi siyah çaylarla ithal yeşil çayların triterpenik asit içerikleri karşılaştırıldığında; iki sürgün dönemi çaylarında triterpenik asit içeriğinin yabancı yeşil çaylara göre daha düşük olduğu görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- Alqahtani S.N., Alkholy S.O., Ferreira M.P., 2014. Antidiabetic and anticancer potential of native medicinal plants from Saudi Arabia, Editors: Watson R.R., Preedy V.R., Zibadi S. *Polyphenols in human health and disease*, Elsevier Inc., USA, 119-134.
- Anderson, M.J. 2000. NPMANOVA: a FORTRAN computer program for non-parametric multivariate analysis of variance (for any two-factor ANOVA design) using permutation tests. Department of Statistics, University of Auckland.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists (17th ed). AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Babalola I.T., Shode F.O., 2013. Ubiquitous ursolic acid: a potential pentacyclic triterpene natural product, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2, 214-222.
- Bernatoniene J., Cizauskaite U., Ivanauskas L., Jakstas V., Kalveniene Z., Kopustinskiene D.M., 2016. Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* leaves. *Industrial Crops and Products*, 84, 72–79.
- Bohlmann J., Keeling C.I., 2008. Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal*, 54, 656-669.
- Bonfill M., Malik S., Mirjalili M.H., Goleniowski M., Cusido R., Palazon J., 2013. Production and Genetic Engineering of Terpenoids Production in Plant Cell and Organ Cultures, Editors: Ramawat K.G., Merillon J.M., *Natural Products- Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2761-2797.
- Brahmkshatriya P.P., Brahmkshatriya P.S., 2013. Terpenes: chemistry, biological role, and therapeutic applications, Editors: Ramawat K.G., Merillon J.M., *Natural Products- Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2667-2684.
- Bravo L., Mateos R., Sarriá B., Baeza G., Lecumberri E., Ramos S., Goya L., 2014. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. *Fitoterapia* 92, 219–229.
- Breitmaier E., 2006. *Terpenes*, Wiley-VCH Verlag, Germany.
- Cabrera C., Artacho R., Gimenez R., 2006. Beneficial effects of green tea-a review, *Journal of the American College of Nutrition*, 25, 79-99.
- Cardozo J. E. L., Morand C., 2016. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 440-454.
- Chizzola R., 2013. Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils), Editors: Ramawat K.G., Merillon J.M., *Natural Products- Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2973-3009.

- Cooper R., 2012. Green tea and theanine: health benefits, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63 (S1): 90-97.
- Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J., 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications, *Nat. Prod. Rep.*, 23, 394–411.
- Fang X., Wang J., Yu X., Zhang G., Zhao J., 2010. Optimization of microwave-assisted extraction followed by RP-HPLC for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *J. Sep. Sci.* 33, 1147–1155.
- Fernandez-Marin M.I., Guerrero R.F., Puertas B., Garcia-Parrilla M.C., Cantos-Villar E., 2013. Functional grapes, Editors: Ramawat K.G., Merillon J.M., *Natural Products-Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2581-2617.
- Frighetto R.T.S., Welendorf R.M., Nigro E.N., Frighetto N., Siani A.C., 2008. Isolation of ursolic acid from apple peels by High speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 106, 767-771.
- Fu Q., Zhang L., Cheng N., Jia M., Zhang Y., 2014. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers. *Food and Bioprocess Processing*, 92, 3, 321-327.
- Gadkari PV, Balaraman M., 2015. Catechins: Sources, Extraction and Encapsulation: A Review. *Food and Bioprocess Processing*, 93, 122-138.
- Gambhava N.S., Ezhava S.B., Rathod I.S., Chhabria M.T., Patwari A.H., 2013. Estimation of ursolic acid and oleanolic acids from leaves of *Plumeria obtusa* by HPTLC method after iodine derivatization. *Der Pharma Chemica*, 5, 44-50.
- Gnoatto S.C.B., Dassonville-Klimpt A., Da Nascimento S., Galera P., Boumediene K., Gosmann G., Sonnet P., Moslemi S., 2008. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 1865-1877
- Geană E.-I., Ionete R.E., Ciocarlan A., Aricu A., Fulga A., Ungur N., Podogova M., Nikolaeva D., 2014. HPLC determination of oleanolic and ursolic acid in apples and apple pomace. *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation*, 17, 2, 53-62.
- Goretti V., Silva I. G. P., Vieira F. N. P., Mendes I. L., Albuquerque R. N. S., Fábio O.S.S.M.M., 2008. Variation of ursolic acid content in eight *Ocimum* species from Northeastern Brazil, *Molecules*, 13, 2482-2487.
- Gotti R., 2011. Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 775–801.
- Gramza A, Korczak J, Amarowicz R., 2005. Tea Polyphenols-Their Antioxidant Properties and Biological Activity- A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14/55 (3), 219–235.
- Hedayati A., Mirjalili M.H., Hadian J., 2015. Quantification of betulinic, oleanolic and ursolic acid as medicinally important triterpenoids in wild and in vitro callus culture of *Salvia sahendica* (Lamiaceae): a comparative study. *J. Bio. & Env. Sci.*, 6, 327-332
- Holopainen, J. K., Nerg, A.-M., Blande, J. D. 2013. Multitrophic signalling in polluted atmospheres. In “Biology, Controls and Models of Tree Volatile Organic Compound Emissions”, eds Ü. Niinemets and R. K. Monson. Springer, Berlin, pp 285-314.
- Hounsborne N., Hounsborne B., 2011. Biochemistry of vegetables: major classes of primary (carbohydrates, amino acids, fatty acids, vitamins, and organic acids) and secondary metabolites (terpenoids, phenolics, alkaloids, and sulfur-containing compounds) in vegetables, Editors: Sinha N.K., Hui Y.H., Evranuz E.Ö., Siddiq M., Ahmed J.,

- Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, Blackwell Publishing, USA, 23-59.
- Ikeda Y., Murakami A., Ohigashi H., 2008. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid, *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 26–42.
- Janicsák G., Veres K., Kállai M., Máthe I., 2003. Gas Chromatographic Method for Routine Determination of Oleanolic and Ursolic Acids in Medicinal Plants. *Chromatographia*, 58, 295-299.
- Janicsák G., Veres K., Kakasy A.Z., Máthe I., 2006. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 392-396.
- Jäger S., Trojan H., Kopp T., Laszczyk M.N., Scheffler A., 2009. Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts, *Molecules*, 14, 2016-2031.
- Jain N., Ramawat K.G., 2013. Nutraceuticals and Antioxidants in Prevention of Diseases, Editors: Ramawat K.G., Merillon J.M., *Natural Products- Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2559-2581.
- Jesus J.A., Lago J.H.G., Laurenti M.D., Yamamoto E.S., Passero L.F.D., 2015. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-14.
- Kacar B., 2010. *Çay, çay bitkisi, biyokimyası, gübrelenmesi, işleme teknolojisi*, Nobel Yayın.
- Khoo G.M., 2011. Bioactive plant foods, PhD Dissertation, Aarhus University, Faculty of Agricultural Sciences, Denmark.
- Kim Y., Wampler D.J., 2009. Determination of Saponin and various chemical compounds in *Camellia sinensis* and *Genus Ilex*. Sensus Technical Note (SEN-TN 027). <http://www.synergytaste.com/sites/synergytaste.com/files/SEN-TN-0027> (erişim tarihi 15.06.2016).
- Koca I., Bostancı Ş., 2014. Oolong çayın üretimi, bileşimi ve sağlık üzerine etkisi. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2, 154-159.
- Kondo M., Mac Kinnon S.L., Craft C. C., Matchett M.D., Hurtac R.A.R., Netoa, C.C., 2011. Ursolic acid and its esters: occurrence in cranberries and other *Vaccinium* fruit and effects on matrix metalloproteinase activity in DU145 prostate tumor cells. *J Sci. Food Agric.* 91, 789-796.
- Kowalski R., 2007. Studies of selected plant raw materials as alternative sources of triterpenes of oleanolic and ursolic acid types, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 656-662.
- Kumar R.S.S., Murugesan S., Kottur G., Gyamfi D., 2013. Black tea: the plants, processing/manufacturing and production. In: Preedy VR. (Ed), *Tea in health and disease prevention*, UK: Elsevier Inc., 41-59.
- Lacikova L., Abdel-Hamid M.E., Novotny L., Masterova I., Grancai D., 2006. A rapid tandem mass spectrometric assay for determination of ursolic acid - application to analysis of ursolic acid in four species of *Staphylea* L. and leaves of *Staphylea Pinnata* L. gathered during ontogenesis. *Chromatographia*, 63, 117-122.
- Lanzotti V., 2013. Diterpenes for Therapeutic Use. *Natural Products- Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Editors: Ramawat K.G., Merillon J.M., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 3173-3193.

- Lee M.K., Ahn Y.M., Lee K.R., Jung J.H., Jung O-S., Hong J., 2009. Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunellae Spica*: Determination of triterpenic acids. *Analytica Chimica Acta*, 633, 271–277.
- Leela N.K., 2002. Studies on the isolation and characterisation of flavones and triterpenoids from a few plants, Doctor of Philosophy, Cochin University of Science and Technology, Faculty of Science, India.
- Li H.-Y., Liu F., Zhang F.-Q., Li X.-L., Liu G.-M., 2010. Determination of ursolic acid and oleanolic acid contents in kuding tea of Aquifoliaceae. *Medicinal Plant*. 1, 62-64.
- Li G.-L., You J.-M., Song C.-H., Xia L., Zheng J., Suo Y.-R., 2011. Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2972–2979.
- Li X., Zhang J.-Y., Gao W.-Y., Wang Y., Wang H.-Y., Cao J.-G., Huang L.-Q., 2012. Chemical composition and anti-inflammatory and antioxidant activities of eight pear cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 8738–8744.
- Liu J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 49, 57-68.
- Liu J., 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 92–94.
- Machado D.G., Neis V.B., Balen G.O., Colla A., Cunha M.P., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G., Prediger R.D., Rodrigues A.L.S., 2012. Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 103, 204-211.
- Morrison, S.A., Li, H., Webster, D., Johnson, J.A., Gray, C.A., 2016. Antimycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant *Sarracenia purpurea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 200-203.
- Murugan K, Al-Sohaibani S., 2013. Coffee, tea and cocoa. In: Chandrasekaran M. (Ed). *Valorization of food Processing by-products*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 455-489.
- Netala V.R., Ghosh S.B., Bobbu P., Anitha D., Tartte V., 2015. Triterpenoidsaponins: a review on biosynthesis, applications and mechanism of their action, *Int J PharmSci*, 7, 24-28.
- Neto C.C., 2010. Ursolic acid and other pentacyclic triterpenoids: anticancer activities and occurrence in berries, Editors: Stoner G.D., Seeram N.P. *Berries and Cancer Prevention*, Springer, New York, 41-49.
- Önder, H., 2007. Using Permutation Tests to Reduce Type I and II Errors for Small Ruminant Research,” *J. Appl. Anim. Res.*, 32 (1), 69 – 72
- Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J., 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare, *Immunol. Ther. Exp.*, 55, 315–327.
- Pai S. R., Joshi R.K. , -Variations in Pentacyclic Triterpenoids in Different Parts of Four *Ocimum* Species Using Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci* (in pres).
- Patocka J., 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicinesignification, *Journal of Applied Biomedicine*, 1, 7-12.
- Perva-Uzunalic A, Škerget M, Knez Ž, Weinreich B, Otto F, Grüner S., 2006. Extraction of Active Ingredients from Green Tea (*Camellia sinensis*): Extraction Efficiency of Major Catechins and Caffeine, *Food Chemistry*, 96 (4), 597–605.
- Pollier J., Goossens A., 2012. Oleanolic acid. *Phytochemistry*, 77, 10–15.

- Razboršek M., Vončina D.B., Doleček V., Vončina E., 2007. Determination of major phenolic acids, phenolic diterpenes and triterpenes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Acta Chim Slov.*, 54, 60–67.
- Razboršek M., Vončina D.B., Doleček V., Vončina E., 2008. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia*, 67, 433–440.
- Sang S., Lambert J.D., Ho C.T., Yang C.S., 2011. The Chemistry and Biotransformation of Tea Constituents. *Pharmacological Research*, 64, 87-99.
- Schneider P., Hosseiny S.S., Szczotka M., Jordan V., Schlitter K., 2009. Rapid solubility determination of the triterpenes oleanolic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents. *Phytochemistry Letters*, 2, 85–87.
- Sell C.S., 2003. *A fragrant introduction to terpenoid chemistry*, UK. Eksik
- Senanayake S.P.J.N., 2015. Antioxidant activity of green tea catechins, Editor: Powell N., *Green tea and health antioxidant properties, consumption and role in disease prevention*. Nova Science Publishers, Inc., New York, 1-20.
- Shanmugam M.K., Dai X., Kumar A.P., Tan B.K.H., Sethi G., Bishayee A., 2013. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies, *Biochemical Pharmacology*, 85, 1579–1587.
- Sharma A., Bajpai V.K., Shukla S., 2013. Sesquiterpenes and Cytotoxicity, Editors: Ramawat K.G., Merillon J.M., *Natural Products- Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 3515-3551.
- Silva J.A., Silva A.G., Alves A.S., Reis R., Nascimento C.C., Diré G.F., Barreto A.S., 2013. *Plumeria rubra* (Apocynaceae): A good source of ursolic acid. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7, 892-896.
- Silva M.G.V., Vieira I.G. P., Mendes F.N.P., Albuquerque I.L., dos Santos R.N., Silva F.O., Morais S.M., 2008. Variation of Ursolic Acid Content in Eight *Ocimum* Species from Northeastern Brazil. *Molecules*, 13, 2482-2487.
- Silva M.L., David J.P., Silva L.C.R.C., Santos R.A.F., David J.M., Lima L.S., Reis P.S., Fontana R., 2012. Bioactive oleanane, lupane and ursane triterpene acid derivatives, *Molecules*, 17, 12197-12205.
- Szakiel A., Pączkowski C., Koivuniemi H., Huttunen S., 2012. Comparison of the Triterpenoid Content of Berries and Leaves of Lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* from Finland and Poland. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 4994–5002.
- Taiz L., Zeiger E., Moller I.M., Murphy A., 2015. Secondary metabolites. *Plant Physiology and Development*, 6th, Sinauer Associates.
- Taralkar S.V., Chattopadhyay S., 2012. A HPLC method for determination of ursolic acid and betulinic acid from the methanolic extracts of *Vitex negundo* Linn. *J Anal Bioanal Techniques*, 3, 134.
- Tarvainen M., Suomela J.-P., Kallio H., Yang B., 2010. Triterpene Acids in *Plantago major*: Identification, Quantification and Comparison of Different Extraction Methods. *Chromatographia*, 71, 279-284.
- Tian S., Shi Y., Yu Q., Upur H., 2010. Determination of oleanolic acid and ursolic acid contents in *Ziziphora clinopodioides* Lam. by HPLC method. *Pharmacognosy Magazine*, 6:116-119.
- Tsai S.-J., Yin M.-C., 2008. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells, *JFS*, 73, 174-178.

- Vági E., Rapavi E., Hadolin M., Vászárhelyiné P, K., Balázs A., Bláovics A., Simándi B., 2005. Phenolic and Triterpenoid Antioxidants from *Origanum majorana* L. Herb and Extracts Obtained with Different Solvents. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 17-21.
- Venugopal R., Liu R.H., 2012. Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid, *Food Science and Human Wellness*, 1, 1–13.
- Vetal M.D., Lade V.G., Rathod V.K., 2012. Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* leaves: Kinetics and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 793–798.
- Vetal M.D., Lade V.G., Rathod V.K., 2013. Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* by ultrasound: Process intensification and kinetic studies. *Chemical Engineering and Processing*, 69, 24–30.
- Vetal M.D., Shirpurkar N.D., Rathod V.K., 2014. Three phase partitioning coupled with ultrasound for the extraction of ursolic acid and oleanolic acid from *Ocimum sanctum*. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 402-408.
- Vuong Q.V., Golding J.B., Nguyen M, Roach P.D., 2010. Extraction and isolation of catechins from tea. *J. Sep. Sci.* 33, 3415-3428.
- Wang H., Wang Z., Guo W., 2008. Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid of *Macrocarpium officinalis* (Sieb. et Zucc.) Nakai by RP-HPLC. *Industrial Crops and Products*, 28, 328–332.
- Wei M.-C., Yang Y.-C., 2014. Extraction characteristics and kinetic studies of oleanolic and ursolic acids from *Hedyotis diffusa* under ultrasound-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technol.*, 130, 182–192.
- Wei M.-C., Yang Y.-C., 2015. Kinetic studies for ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction of triterpenic acids from healthy tea ingredient *Hedyotis diffusa* and *Hedyotis corymbosa*. *Separation and Purification Technology*, 142, 316–325.
- Wójciak-Kosior M., Sowa I., Kocjana R., Nowak RR., 2013. Effect of different extraction techniques on quantification of oleanolic and ursolic acid in *Lamial biflos*. *Industrial Crops and Products*, 44, 373- 377.
- Xia E-Q., Wang B-W., Xu X.-R., Zhu L., Song Y., Li H.-B., 2011. Microwave-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 5319-5329.
- Xia E-Q., Yu Y.-Y., Xu X.-R., Deng G.-F., Guo Y.-J., Li H.-B., 2012. Ultrasound-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 772–776.
- Xu X-H., Su Q., Zang Z.-H., 2012. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2, 238–240.
- Yang Y.-C., Wei M.-C., 2015. Kinetic and characterization studies for three bioactive compounds extracted from *Rabdosia rubescens* using ultrasound. *Food and Bioproducts Processing*. 94, 101-113.
- Yang Y.C., Wei M.C., Hong S.J., Huang T.C., Lee S.Z., 2013. Development/ optimization of a green procedure with ultrasound-assisted improved supercritical carbon dioxide to produce extracts enriched in oleanolic acid and ursolic acid from *Scutellaria barbata* D. Don. *Industrial Crops and Products*, 49, 542– 553.
- Zacchigna M., Cateni F., Faudale M., Sosa S., Loggia R.D., 2009. Rapid HPLC analysis for quantitative determination of the two isomeric triterpenic acids, oleanolic acid and ursolic acid in *Plantago major*. *Sci Pharm.* 77, 79–86.

- Zhang F., Daimaru E., Ohnishi M., Kinoshita M., Tokuji Y., 2013. Oleanolic acid and ursolic acid in commercial dried fruits. *Food Sci. Technol. Res.*, 19, 113-116.
- Zhang S., Sun Y., Sun Z., Wang X., You J., Suo Y., 2014. Determination of triterpenic acids in fruits by a novel high performance liquid chromatography method with high sensitivity and specificity. *Food Chemistry*, 146, 264–269.
- Zhang H.J, Qiu M.H, Chen Y.G., Chen J.X., Sun Y., Wang C.F., Fong H.H.S., 2016. Plant Terpenes, in Natural Products, edited by Pezzuto, John and Kato, Massuo Jorge, in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [<http://www.eolss.net>], in press.
- Zheng, M., Xia, Q., Lu, S., 2015. Study on drying methods and their influences on effective components of loquat flower tea. *LWT-Food Science and Technology*, 63, 14-20.
- Zhou C., Chen K., Sun C., Chen Q., Zhang W., Li X., 2007. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. by HPLC. *Biomed. Chromatogr.* 21, 755–761.
- Zhou C. S., Zhao Y., Wang D., Tao J., 2010. Variation of oleanolic and ursolic acid in the flesh of Persimmon fruit among different cultivars. *Molecules*, 15, 6580-6587.
- Zhou C.-H., Li X., Zhang W.-S., Sun C.-D., Chen K.-S., 2011. Oleanolic and ursolic acid in the fruit of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 1735-1740.
- Zwenger S., Basu C., 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3, 1-7.

7. EKLER

EK A:Yerli siyah çayların triterpenik asit kromatogramı

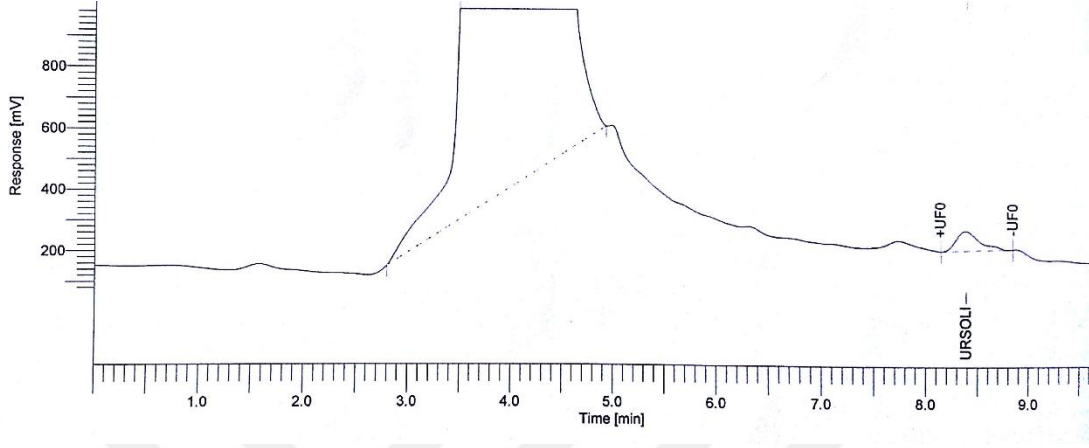
EK B:İthal siyah çayların triterpenikasit kromatogramı

EK C:İthal yeşil aylarıb triterpenik asit kromatogramı

EK D:Farklı sürgün dönemine ait siyah çayların triterpenik asitkromatogramları

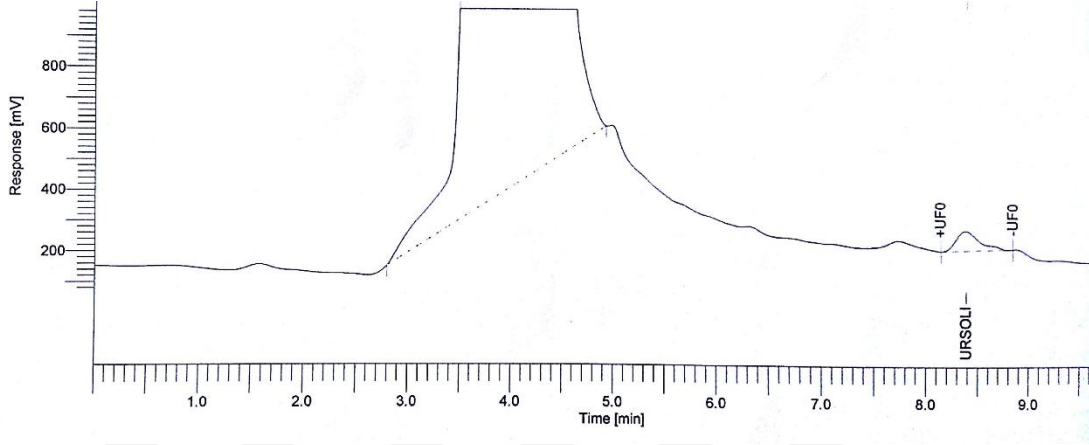


EK A



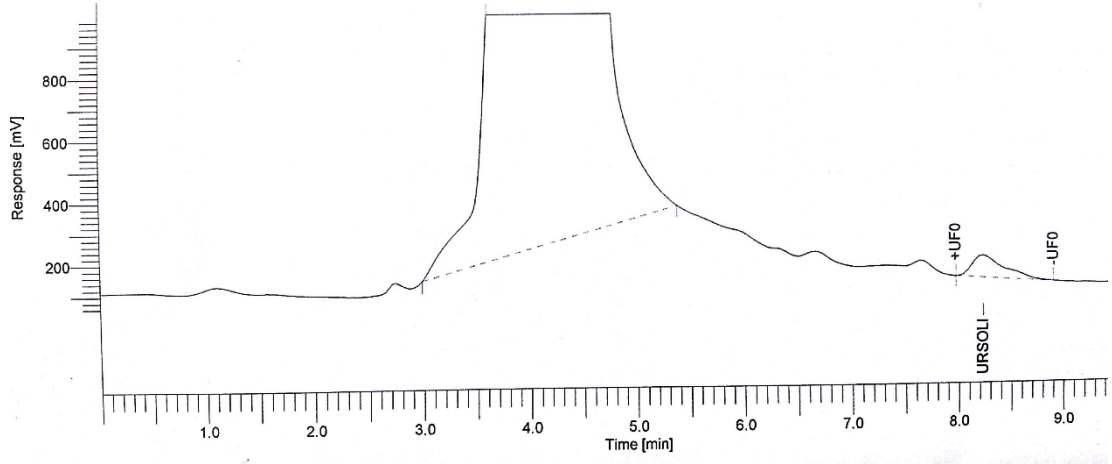
Şekil A1: Yerli siyah çayların triterpenik asit kromatogramı

EKB



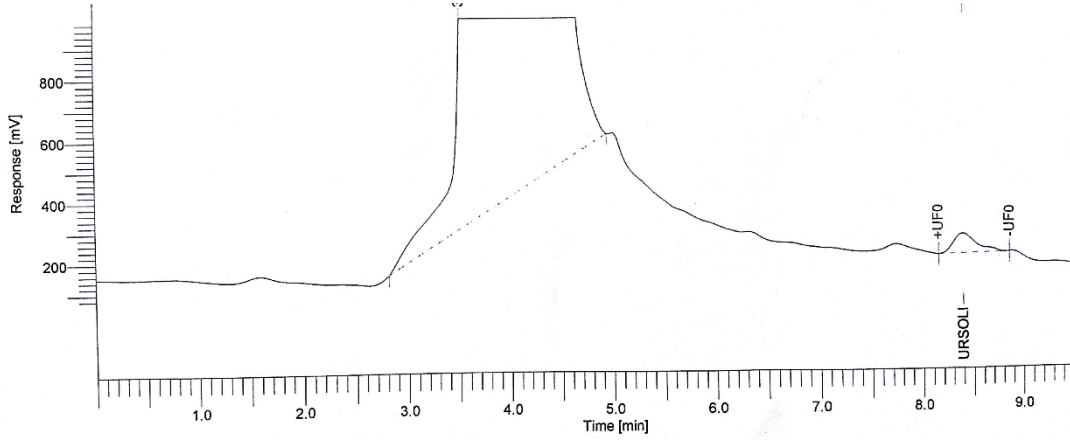
Şekil B1:İthal siyah çayların triterpenik asit kromatogramı

EK C

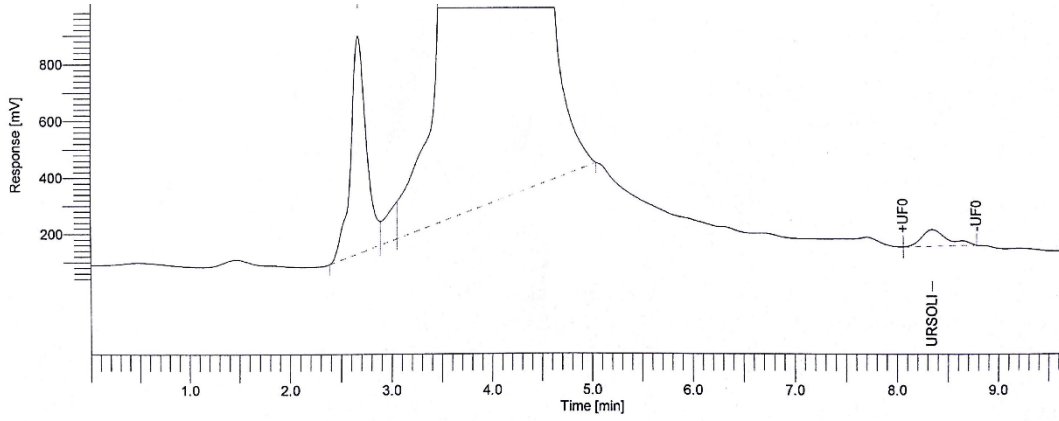


Şekil C1: İthal yeşil çayların triterpenik asit kromatogramı

EKD



Şekil D1: 1. sürgün dönemine ait siyah çayların triterpenik asit kromatogramı



Şekil D2: 2. sürgün dönemine ait siyah çayların triterpenik asit kromatogramı

kromatogram

ÖZGEÇMİŞ



AdıSoyadı : Burak İPEKÇİ

DoğumYeriveTarihi: Tarsus 1985

Adres: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

E-Posta: ipekci_burak@hotmail.com

Lisans:Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği