

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLERİ EKSTRAKSİYON TEKNOLOJİLERİ İLE
ANTI-TİROZİNAZ ETKİLİ ANTOSİYANİNCE ZENGİN
EKSTRE ELDESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı


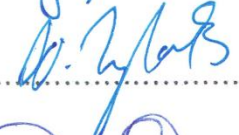



Doktora Tezi

**Uzman Eczacı
Halil KOYU**

**Danışman
Doç. Dr. M. Zeki Haznedaroğlu**

**İZMİR
2017**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı	İmza
Başkan : Doç. Dr. M. Zeki HAZNEDAROĞLU (Danışman)	
Üye : Prof. Dr. Ulvi ZEYBEK	
Üye : Prof. Dr. Gaye ÖNGEN	
Üye : Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ	
Üye : Prof. Dr. İrem TATLI ÇANKAYA	

Doktora tezinin kabul edildiği tarih: 17.03.2017

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince yol gösterici olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. M. Zeki Haznedaroğlu'na teşekkür ederim.

Süperkritik akışkan teknolojisi ile ilgili çalışmalarımda destek olan ve laboratuvarını kullanmamı sağlayan Doç. Dr. Özlem Yeşil Çeliktaş'a teşekkür ederim.

Hayatımın son on senesinin şekillendiği Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ilgi ve yakınlıkları için teşekkür ederim.

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Öncül Akışkan Teknolojileri Laboratuvarı ve Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarının (FABAL) yetkililerine çalışmalarına imkan tanıdıkları için teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca karşılaştığım sorunlarda yardımlarını eksik etmeyen Doç. Dr. Burcu Okutucu, Arş. Gör. Dr. Serdar Demir, Yük. Biyomüh. Aslıhan Kazan, Uzm. Kim. Taylan Öztürk, Uzm. Ecz. Fadime Aydoğan, Yük. Kim. Müh. Çiğdem Yengin ve Uzm. Dr. Volkan Eroğlu'na teşekkür ederim.

Sonsuz sevgisi ile daima yanımda olan başta eşim Uzm. Dyt. Ezgi Bellikci Koyu ve annem Ecz. Şadiye Koyu olmak üzere tüm aileme minnettarım.

Bu çalışmanın maddi olarak desteklenmesini sağlayan YÖK (ÖYP fonu) ve TÜBİTAK'a (3001 Proje, No.216S839) teşekkür ederim.

İzmir 2017

Uzm. Ecz. Halil KOYU

ÖZET

İleri Ekstraksiyon Teknolojileri ile Anti-tirozinaz Etkili Antosiyanince Zengin Ekstre Eldesinin Araştırılması

Hastalıkların tedavisinde doğal kaynaklı ürünlerin kullanımı, gelişmekte olan ülkelerde geniş bir yer tutmakta ve gelişmiş ülkelerde tamamlayıcı tedavi olanaklarının değerlendirilmesi açısından önemini korumaktadır.

Hastalıkların gelişim mekanizmalarının aydınlatılması ve tedavide doğru yaklaşımın uygulanması, bitkisel ilaç üretiminde yol gösterici olmaktadır. Tirozinaz enziminin hiperpigmentasyon, melanoma ve Parkinson hastalığının oluşumunda rol oynadığı ortaya konmuştur. Bu hastalıkların tedavisinde tirozinaz enzim aktivitesini inhibe edebilen ajanların etkili olduğu gösterilmiştir. Birçok sentetik ve doğal kaynaklı bileşiğin tirozinaz inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş olsa da kullanımları güvenlik sınırları nedeniyle kısıtlı kalmaktadır. Kozmetik ve ilaç endüstrisi açısından doğal kaynaklı bileşiklerin tirozinaz inhibitör aktivite sunma potansiyelleri büyük önem taşımaktadır.

Organik çözücü kullanımını azaltan/ortadan kaldıran ileri ekstraksiyon teknolojileri, kaynakların etkin ve verimli kullanımı ile insan ve çevre sağlığının korunmasına yönelik fayda sağlamaktadır. Ekstraksiyon işlemlerine etki eden birçok parametre bulunması sebebiyle ileri ekstraksiyon sistemleri gelişmeye açık alanlardır. Ekstraksiyon işlemleri için enerji, çözücü, süre, hammadde ihtiyacının azaltılmasının yanısıra biyoaktif bileşenlerin eldesine yönelik olarak yüksek verim ve seçicilikte sistemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışmada *Morus nigra* L. meyvelerinden, ileri ekstraksiyon teknolojileri olarak tanımlanan süperkritik karbondioksit, subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemlerinin antosiyanince zengin ekstre eldesine yönelik olarak optimizasyonu sağlanmış ve elde edilen ekstre ve fraksiyonların tirozinaz inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır. Spektrofotometrik olarak toplam fenol, flavonoid ve antosiyanin miktar tayinleri yapılmış ve UPLC-DAD-ESI-MS/MS ile antosiyanin türevi moleküller siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit kalitatif ve kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon çalışmaları ile aktiviteden sorumlu fraksiyonlar belirlenerek kompozisyon aktivite ilişkisi ortaya konulmuştur.

Etanol:su:TFA (70:29:1) karışımı konvansiyonel çözücü ekstraksiyonunda kullanılmış ve inhibitör aktivite IC₅₀ değeri 2,62 mg/mL olarak bulunmuştur.

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda optimum koşullar 60 °C, 200 bar, %8 co-solvan etanol olarak belirlenmiş ve ekstrenin ve aktiviteden sorumlu fraksiyonun tirozinaz inhibitör aktivite IC₅₀ değeri sırasıyla 0,344 mg/mL ve 10,69 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Subkritik su ekstraksiyonunda optimum koşullar 60 °C ile 120 °C, 60 dk, 2 ml/dk olarak belirlenmiş ve ekstrelerin ve aktiviteden sorumlu fraksiyonun tirozinaz inhibitör aktivite IC₅₀ değeri sırasıyla 1,84 ve 1,71 mg/mL ve 86,75 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Mikroalga destekli ekstraksiyonda optimum koşullar 500 watt, %35 etanol, 10 dk olarak belirlenmiş ve ekstrenin ve aktiviteden sorumlu fraksiyonun tirozinaz inhibitör aktivite IC₅₀ değeri sırasıyla 1,44 mg/mL ve 166,50 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Optimize subkritik su ve mikroalga destekli ekstraktelerde aktiviteden sorumlu fraksiyonların LC-MS/MS analizinde başlıca siyanidin-3-glikozit (293,10 mg/g) ve siyanidin-3-rutinozit (125,12mg/g) içerdiği ve toplam antosiyanin miktarının 418,22 mg siy-3-gliE/g ekstre değerine ulaştığı belirlenmiştir.

Optimize ekstraksiyon koşullarında endüstriyel üretim ve büyük ölçekli çalışmalara kaynak sağlanmasına yönelik olarak antosiyanince zengin farklı bitkisel kaynaklar olan zirai kültür formları *Raphanus sativus* 'Red Meat' kök ve *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* topraküstü kısımları ile çalışmalar yürütülmüştür. *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* topraküstü kısımlarının Ekstrelerinde saptanan 31,74 mg GAE/g toplam fenol, 3,46 mg KE/g total flavonoit ve 11,83 mg siy3-gliE/g ekstre toplam antosiyanin değerleri (IC₅₀: 1,26 mg/mL) ile büyük ölçekli çalışmalara ve üretime yönelik olarak kullanıma uygun olabileceği tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile elde edilen veriler ışığında ileri ekstraksiyon teknolojileri kullanılarak floramızda var olan antosiyaninler bakımından zengin diğer bitkisel kaynakların da değerlendirilmesi ve ülkemiz ekonomisine katkıda bulunabilmesi sağlanabilecektir.

Anahtar kelimeler: *Morus nigra*, süperkritik akışkan, LC-MS/MS, antosiyanin, tirozinaz inhibitör

ABSTRACT

Investigation of Isolation of Anthocyanin Rich Extracts with Advanced Extraction Technologies Exhibiting Anti-tyrosinase Activity

The usage of naturally derived products in the treatment of diseases has a large share in developing countries and keeps its importance as complementary medicine in developed countries.

Enlightenment of disease development mechanisms and application of the right approach for treatment, guides the production of herbal medicines. The enzyme tyrosinase has been shown to play role in the formation of hyperpigmentation, melanoma and Parkinson's disease. Agents which are able to inhibit tyrosinase activity have been shown to be effective in the treatment of these diseases. While many synthetic and naturally occurring compounds have been shown to possess tyrosinase inhibitory activity, their usage is limited due to safety limitations. For the cosmetics and pharmaceutical industry, the potential of natural compounds for tyrosinase inhibitory activity are of great importance.

Advanced extraction technologies which reduce/eliminate organic solvent usage, provide effective and efficient use of resources while utilized for protection of human and environmental health. As many parameters affect extraction processes, advanced extraction systems are open areas for development. While reducing the amount of energy, solvent, time and raw material needs for extraction, development of systems with high efficiency and selectivity has been aimed to obtain bioactive components.

In this study, supercritical carbon dioxide, subcritical water and microwave assisted extraction systems, which are defined as advanced extraction technologies, were optimized for the extraction of anthocyanin rich extracts from *Morus nigra* L. fruits and the tyrosinase inhibitory activities of extracts and fractions were investigated. Quantitative determinations of total phenol, flavonoid and anthocyanin contents were carried out with spectrophotometer and the anthocyanin derivatives cyanidin-3-glycoside, cyanidin-3-rutinoside, pelargonidin-3-glycoside and pelargonidin-3-rutinoside were determined by UPLC-DAD-ESI-MS/MS

qualitatively and quantitatively. Active fractions were identified with isolation studies and composition activity relationship was determined.

Ethanol:water:TFA (70:29:1) solvent mixture was used for the conventional solvent extraction and IC₅₀ value for tyrosinase inhibitory activity was found as 2.62 mg/mL.

Optimum conditions for supercritical carbon dioxide extraction were determined as 60 °C, 200 bar, 8% co-solvent ethanol and IC₅₀ of the extract and isolated active fraction for tyrosinase inhibitory activity was found as 0.344 mg/mL and 10.69 µg/mL, respectively.

Optimum conditions for subcritical water extraction were determined as 60 °C and 120 °C, 60 min, 2 ml/min and IC₅₀ of the extracts and isolated active fraction for tyrosinase inhibitory activity was found as 1.84 and 1.71 mg/mL and 86.75 µg/mL, respectively.

Optimum conditions for microwave assisted extraction were determined as 500 watt, 35% ethanol, 10 min and IC₅₀ of the extract and isolated active fraction for tyrosinase inhibitory activity was found as 1.44 mg/mL and 166.50 µg/mL, respectively.

In the optimized subcritical water and microwave assisted extracts, composition of active fractions were determined with LC-MS/MS as majorly composed of cyanidin-3-glycoside (239,10 mg/g) and cyanidin-3-rutinoside (125,12 mg/g) reaching an anthocyanin amount of 418.22 mg cya-3-gluE/g extract.

Raphanus sativus 'Red Meat' root and *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* aerial parts as plant sources rich in anthocyanins, were studied with optimized extraction conditions in order to investigate availability for large scale work and industrial production. The extracts of *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* were determined as suitable for large scale work and production with 31.74 mg GAE/g total phenol, 3,46 mg KE/g total flavonoid and 11,83 mg cya-3-gluE/g total anthocyanin content (IC₅₀: 1.26 mg/mL) values.

By using the data obtained from this study, it could be possible to evaluate other plant sources of our flora rich in anthocyanins and contribute to our country's economy using advanced extraction techniques.

Keywords: *Morus nigra*, supercritical fluid, LC/MS-MS, anthocyanin, tyrosinase inhibitor

İÇİNDEKİLER

KROMATOGRAMLAR LİSTESİ	VII
RESİMLER LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
TABLolar LİSTESİ	X
KISALTMALAR	XIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. MORACEAE FAMILYASI.....	5
2.2. MORUS L. CİNSİ	5
2.2.1. <i>Morus</i> türleri ile ekstraksiyon ve analiz çalışmaları.....	6
2.2.2. <i>Morus</i> türleri ile aktivite çalışmaları.....	8
2.3. MORUS NIGRA L. TÜRÜ.....	9
2.3.1. <i>Morus nigra</i> L. Dünyada ve Türkiye’de Yayılışı.....	10
2.3.2. <i>Morus nigra</i> L. Genel Kimyasal Özellikleri.....	11
2.3.3. <i>Morus nigra</i> L. Tıbbi Amaçlı Kullanımı	11
2.3.4. <i>Morus nigra</i> L. Ekstraksiyon ve Analiz Çalışmaları	11
2.3.5. <i>Morus nigra</i> L. Aktivite Çalışmaları	13
2.4. ANTOSİYANİNLER.....	14
2.5. EKSTRAKSİYON SİSTEMLERİ	18
2.5.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri	18
2.5.2. İleri Ekstraksiyon Teknolojileri	19
2.6. TİROZİNAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE.....	20
BÖLÜM 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1 KULLANILAN GEREÇLER.....	22
3.2. BİTKİSEL MATERYAL	23
3.2.1. Bitkisel Materyalin Temini	23
3.2.2. <i>Morus nigra</i> L. Morfolojik Özellikleri ve Anatomik Yapıların İncelenmesi	24
3.3. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR	24
3.3.1. Ekstraksiyon Çalışmaları.....	24
3.3.1.1 Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri	24
3.3.1.2. İleri Ekstraksiyon Teknolojileri	25

3.3.1.2.1. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu.....	25
3.3.1.2.2. Subkritik Su Ekstraksiyonu.....	26
3.3.1.2.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon.....	29
3.3.2. Analiz çalışmaları	31
3.3.2.1. Spektrofotometrik Analizler	31
3.3.2.1.1. Toplam Fenol Tayini	31
3.3.2.1.2. Toplam Flavonoit Tayini.....	31
3.3.2.1.3. Toplam Antosiyanin Tayini	31
3.3.2.2. LC-MS/MS Analizleri.....	32
3.3.2.3. Aktiviteden Sorumlu Fraksiyonun Tespiti	33
3.3.3. Ekstraksiyon ve Analiz Validasyonu.....	34
3.4. TIROSİNAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE ÇALIŞMALARI	35
3.4.1. Aktivite Protokolü Optimizasyonu.....	35
3.4.2. Enzim İnhibisyon Kinetikleri	36
3.4.3. Ekstrelerin Tirozinaz İnhibitör Aktivitesinin Araştırılması	36
BÖLÜM 4. BULGULAR.....	37
4.1. BOTANİK BULGULAR.....	37
4.2. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR.....	42
4.2.1. Bitkisel Materyal.....	42
4.2.2. Analiz Çalışmalarına Ait Bulgular.....	44
4.2.2.1. Spektrofotometrik Analizler	44
4.2.2.2. LC-MS/MS Analizleri.....	46
4.2.3. Konvansiyonel ekstraksiyonlara ait bulgular	52
4.2.4. İleri Ekstraksiyon Teknolojileri Bulguları.....	56
4.2.4.1. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu Optimizasyonu.....	56
4.2.4.2. Subkritik Su Ekstraksiyon Optimizasyonu	59
4.2.4.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Optimizasyonu	68
4.2.4.4. Aktiviteden Sorumlu Bileşenlerin Tespitine Yönelik Fraksiyonlama Çalışmalarına ait Bulgular	76
4.2.4.5. Optimize Ekstraksiyon Sistemleri ile Antosiyanince Zengin Alternatif Kaynakların Araştırılmasına ait Bulgular.....	78
4.2.4.6. Ekstraksiyon ve Analiz Validasyonu Çalışmaları.....	81
4.3. TIROZİNAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	91

4.3.1. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Protokolünün Oluşturulması	94
4.3.2. Enzim İnhibisyon Kinetik Çalışmaları Bulguları	98
4.3.3. Ekstrelerin Tirozinaz İnhibitör Aktiviteleri.....	100
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	107
KAYNAKLAR	128

KROMATOGRAMLAR LİSTESİ

Kromatogram 1. Metot 1 ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları.....	46
Kromatogram 2. Metot 1 ile <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları.....	47
Kromatogram 3. 100 x 2.1 mm, 3 µm kolonda Metot 2 ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları.....	47
Kromatogram 4. 50 x 2.1 mm, 1,7 µm kolonda Metot 2 ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları.....	48
Kromatogram 5. 100 x 2.1 mm, 3 µm kolonda Metot 2 ile <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları.....	48
Kromatogram 6. 50 x 2.1 mm, 1,7 µm kolonda Metot 2 ile <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları.....	49
Kromatogram 7. 300 µl/dk akış hızında Metot 2 ile <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları	49
Kromatogram 8. Metot 3 ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları.....	50
Kromatogram 9. Metot 3 ile <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları.....	50
Kromatogram 10. 40 °C kolon fırın sıcaklığında Metot 3 ile <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları	51
Kromatogram 11. Geliştirilen analiz metodu ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları	51
Kromatogram 12. Geliştirilen analiz metodu ile <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları	52
Kromatogram 13. Orbital çalkalayıcı ekstresi MS ve 515 nm DAD kromatogramları	54

Kromatogram 14. Ultrasonik banyo ekstresi MS ve DAD kromatogramları.....	55
Kromatogram 15. 200 bar, 60 °C, %40 co-solvan koşulları ile süperkritik CO ₂ ekstresi MS ve DAD kromatogramı.....	59
Kromatogram 16. 60 °C, 60 dk, 2 mL/dk. koşulları ile subkritik su ekstresi MS ve DAD kromatogramı	67
Kromatogram 17. 100 °C, 60 dk, 2 mL/dk. koşulları ile subkritik su ekstresi MS ve DAD kromatogramı	67
Kromatogram 18. 500 watt, %35 etanol, 10 dk koşulları ile mikrodalga destekli ekstre mikrodalga destekli MS ve DAD kromatogramı	76
Kromatogram 19. 300 watt, %70 etanol, 10 dk koşulları ile mikrodalga destekli ekstre MS ve DAD kromatogramı.....	76
Kromatogram 20. <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi RP-silika fraksiyonlarına ait 515 nm DAD kromatogramları	77
Kromatogram 21. <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi RP-silika fraksiyonlarına ait 515 nm DAD kromatogramları	77
Kromatogram 22. Aktiviteden sorumlu fraksiyonun (Fraksiyon 52) MS ve DAD kromatogramları.....	78
Kromatogram 23. Kör ekstraksiyon MS ve DAD kromatogramları	81
Kromatogram 24. Siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları ile UV spektrumu.....	82
Kromatogram 25. Orbital çalkalayıcı ile üç paralel ekstraksiyona ait MS ve DAD kromatogramları.....	82
Kromatogram 26. Ultrasonik banyo ile üç paralel ekstraksiyona ait MS ve DAD kromatogramları.....	83
Kromatogram 27. Geri kazanım validasyonu MS ve DAD kromatogramları.....	84
Kromatogram 28. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği çalışması MS kromatogramları	87
Kromatogram 29. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği çalışması DAD kromatogramları	87
Kromatogram 30. Güniçi stabilite validasyonu MS ve DAD kromatogramları.....	89
Kromatogram 31. Günler arası stabilite validasyonu MS ve DAD kromatogramları ..	90

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. <i>Morus nigra</i> L.	10
--	----

Resim 2. <i>Morus nigra</i> L. genel görünüş.....	23
Resim 3. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon sistemi	25
Resim 4. Subkritik su ekstraksiyon sistemi.....	27
Resim 5. Mikrodalga ekstraksiyon sistemi.....	29
Resim 6. Yaprak üst yüzeyi sert kılsı (scabrous) örtü tüyleri (x25 ve x80 büyütme)	38
Resim 7. Yaprak alt yüzeyi yumuşak örtü tüyleri (pubescent) (x25 ve x80 büyütme) ..	38
Resim 8. Yaprak sapı basık kılsı örtü tüyleri (adpressed setaceous) (x80 büyütme).....	39
Resim 9. Yaprak enine kesiti, düz ve kancalı tip örtü tüyleri (x100 büyütme).....	39
Resim 10. Yaprak üst yüzeyi kalkansı salgı tüyleri (peltate gland) yüzeysel kesit (x100 büyütme)	40
Resim 11. Yaprak üst yüzeyi kalkansı salgı tüyleri (peltate gland) yüzeysel kesit (x400 büyütme)	40
Resim 12. Yaprak şekli varyasyonları; basit ve 3-loblu yapraklar.....	41
Resim 13. Yaprak özellikleri; lamina ucu, tabanı ve kenarı	41
Resim 14. <i>Morus nigra</i> meyveleri.....	42
Resim 15. <i>Morus nigra</i> liyofilize meyveler	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Tirozinaz enzimi aracılığı ile melanin oluşumu	2
Şekil 2. <i>Morus nigra</i> Türkiye’de yayılışı	10
Şekil 3. Antosiyanidin yapısı.....	15
Şekil 4. Ortam pH’sine göre antosiyanidin yapısında değişim	16
Şekil 5. Antosiyanidinlerin fenolik asitlere yıkımı.....	17
Şekil 6. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 7. Kersetin kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 8. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda anlamlı etkiye sahip parametrelerin tirozinaz inhibitör aktivite açısından sonuçlarını gösteren 3D diyagram.....	58
Şekil 9. Subkritik su ekstraksiyonunda anlamlı etkiye sahip parametrelerin biyoaktif bileşenler açısından sonuçlarını gösteren 3D diyagramlar.....	64
Şekil 10. Subkritik su ekstraksiyonunda optimum sıcaklıkta (60 °C) ekstraksiyon zamanı ile akış hızı etkisini gösteren 3D diyagram	65
Şekil 11. Subkritik su ekstraksiyonunda optimum ekstraksiyon süresinde (60 dk) ekstraksiyon zamanı ile akış hızı etkisini gösteren 3D diyagram	65

Şekil 12. Subkritik su ekstraksiyonunda optimum akış hızında (2 mL/dk) sıcaklık ile ekstraksiyon süresi etkisini gösteren 3D diyagram.....	65
Şekil 13. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda anlamlı etkiye sahip parametrelerinin biyoaktif bileşenler açısından sonuçları (3D diyagramlar)	72
Şekil 14. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum ekstraksiyon süresinde (10 dk) mikrodalga gücü ile etanol oranı etkisini gösteren 3D diyagram	73
Şekil 15. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum etanol oranında (%35) mikrodalga gücü ile ekstraksiyon süresi etkisini gösteren 3D diyagram.....	73
Şekil 16. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum mikrodalga gücünde (500 watt) etanol oranı ile ekstraksiyon süresi etkisini gösteren 3D diyagram.....	73
Şekil 17. Siyanidin-3-glikozit kalibrasyon eğrisi	86
Şekil 18. Protokol 1 ile gerçekleştirilen tirozinaz inhibitör aktivite çalışması sonuçları	91
Şekil 19. Protokol 1 ile Lineweaver-Burk grafiği	92
Şekil 20. Protokol 2 ile Lineweaver-Burk grafiği	92
Şekil 21. Protokol 3 ile Lineweaver-Burk grafiği	93
Şekil 22. Tirozinaz aracılığı ile L-dopa'nın zamana bağlı olarak dopakroma dönüşümü	94
Şekil 23. 200 Unit/mL tirozinaz ile L-dopa'nın farklı konsantrasyonlarında kojik asit inhibisyonu.....	95
Şekil 24. 50 Unit/mL tirozinaz ile L-dopa'nın farklı konsantrasyonlarında kojik asit inhibisyonu.....	96
Şekil 25. Substrat bulunmayan ortamda tirozinaz ile ekstrelerin etkileşimi	97
Şekil 26. Oluşturulan tirozinaz inhibitör aktivite çalışma protokolü ile.....	98
Şekil 27. Oluşturulan tirozinaz inhibitör aktivite çalışma protokolü ile.....	99

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Süperkritik CO ₂ ekstraksiyonu deney deseni.....	26
Tablo 2. Subkritik su ekstraksiyonu deney deseni	28
Tablo 3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon deney deseni	30
Tablo 4. <i>Morus nigra</i> yapraklarında morfolojik varyasyonlar.....	37
Tablo 5. <i>Morus nigra</i> meyvelerinde morfolojik varyasyonlar.....	41
Tablo 6. Liyofilizasyon seri 1 sonuçları.....	43
Tablo 7. Liyofilizasyon seri 2 sonuçları.....	43
Tablo 8. Liyofilizasyon seri 3 sonuçları.....	44

Tablo 9. Liyofilizasyon serileri sonuçları	44
Tablo 10. 70:29:1 (etanol:su:asit) çözücü ekstraksiyonu ön çalışmaları	53
Tablo 11. Orbital çalkalayıcı ekstresi miktar tayinleri.....	53
Tablo 12. Ultrasonik banyo ekstresi miktar tayinleri.....	55
Tablo 13. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon optimizasyonu deneysel sonuçları ..	56
Tablo 14. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu optimum koşulları.....	56
Tablo 15. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon optimizasyonunda.....	57
Tablo 16. Süperkritik CO ₂ ekstraksiyonu ek çalışmaları	58
Tablo 17. Subkritik su ekstraksiyon optimizasyonu deneysel sonuçları.....	60
Tablo 18. Subkritik su ekstraksiyonunda toplam fenol ve antosiyanin miktarı ile	61
Tablo 19. Subkritik su ekstraksiyonunda toplam flavonoit miktarı açısından optimum koşullar.....	62
Tablo 20. Subkritik su ekstraksiyonunda tirozinaz inhibitör aktivite açısından optimum koşullar.....	62
Tablo 21. Subkritik su ekstraksiyon optimizasyonunda yanıt yüzey metodolojisi istatistiksel model sonuçları	63
Tablo 22. Subkritik su ekstraksiyonu optimum ekstreleri	66
Tablo 23. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu deneysel sonuçları	68
Tablo 24. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenol miktarı açısından optimum koşullar.....	69
Tablo 25. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoit miktarı açısından optimum koşullar	69
Tablo 26. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarı ve	70
Tablo 27. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda tirozinaz inhibitör aktivite açısından optimum koşullar	71
Tablo 28. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonunda.....	71
Tablo 29. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimum ekstreleri (drog:çözücü 1:50) ...	74
Tablo 30. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimum ekstreler (drog:çözücü 1:10)	75
Tablo 31. <i>Morus nigra</i> meyve ekstresi RP-silika fraksiyonlarının LC-MS/MS analizi	78
Tablo 32. Optimize ekstraksiyon koşullarında antosiyanince zengin farklı bitkisel droglar (herba) ile çalışmalar	79
Tablo 33. Optimize ekstraksiyon koşullarında antosiyanince zengin farklı bitkisel droglar (kök) ile çalışmalar	80
Tablo 34. Ekstraksiyon tekrarlanabilirliği validasyonu sonuçları.....	83

Tablo 35. Geri kazanım validasyonu sonuçları	84
Tablo 36. Ekstraksiyon sonrası atılan kısımda miktar tayini sonuçları	85
Tablo 37. Siyanidin-3-glikozit kalibrasyon eğrisi sonuçları	86
Tablo 38. Analiz tekrarlanabilirliği sonuçları	88
Tablo 39. Gün içi stabilite sonuçları	89
Tablo 40. Günler arası stabilite sonuçları	90
Tablo 41. Tirozinaz inhibisyon reaksiyon ortamında DMSO miktarı sınırı	97
Tablo 42. Kojik asidin tirozinaz inhibisyon tipini gösteren sonuçlar	99
Tablo 43. Kojik asit IC ₅₀ değeri	100
Tablo 44. Konvansiyonel çözücü ekstraktları tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları.....	101
Tablo 45. Süperkritik CO ₂ ekstraksiyon optimizasyonu	101
Tablo 46. Süperkritik CO ₂ ekstraktlarının tirozinaz inhibitör aktiviteleri	101
Tablo 47. Optimum süperkritik CO ₂ ekstresinde etkiden sorumlu fraksiyonun	102
Tablo 48. Subkritik su ekstraksiyon optimizasyonu tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları	102
Tablo 49. Subkritik su ekstraktlarının tirozinaz inhibitör aktiviteleri	103
Tablo 50. Optimum subkritik su ekstresinde etkiden sorumlu fraksiyona.....	103
Tablo 51. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları	104
Tablo 52. Mikrodalga ekstraktlarının tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları	104
Tablo 53. Optimum mikrodalga ekstresinde etkiden sorumlu fraksiyona	105
Tablo 54. Optimum ekstraksiyon sistemlerinde <i>Raphanus sativus</i> ‘Red Meat’ ekstraktlarının tirozinaz inhibitör aktivitesi	105
Tablo 55. Optimum ekstraksiyon sistemlerinde <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i> ekstraktlarının tirozinaz inhibitör aktivitesi	106

KISALTMALAR

AKK	Açık Kolon Kromatografisi
CO ₂	Karbondioksit
DAD	Diode array dedektör
DMSO	Dimetilsülfoksit
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
EtOH	Etanol
g	Gram
GAE	Gallik asit eşdeğeri
IC ₅₀	%50 inhibitör konsantrasyon
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
KE	Kersetin eşdeğeri
L.	Carl Linnaeus
LC-MS	Sıvı kromatografisi–kütle spektrometrisi
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MS	Kütle spektrometrisi
RP-C18	Terz faz silika
Siy-3-gliE	Siyanidin-3-glikozit eşdeğeri
TFA	Trifloroasetik asit
UV	Ultraviöle
VSK	Vakum sıvı kromatografisi
YBSK	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar

BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yüzyıllardır hastalıkların tedavisinden bitkilerden elde edilen preparatlar fayda sağlamaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde doğal kaynaklı ürünler tedavide geniş bir yer tutmakta iken gelişmiş ülkelerde ise tamamlayıcı tedavi olanaklarının değerlendirilmesi açısından önemini korumaktadır (1).

Hastalıkların tedavisine yönelik olarak bitkisel droglardan ürün geliştirilmesi aşamasında hastalık gelişim mekanizmalarının belirlenerek doğru yaklaşımın uygulanması yol gösterici olmaktadır. Tirozinaz enziminin hiperpigmentasyon, melanoma (Şekil 1) ve Parkinson hastalığının oluşumunda rol oynadığı ortaya konmuştur. Tirozinaz enzimi cilt hastalıklarına yol açan aşırı melanin pigmenti sentezini katalizlerken, dopaminerjik nöronlarda bulunan nöromelanin kaynaklı oksidasyon ile sinir hücresi dejenerasyonuna sebep olarak Parkinson hastalığının gelişiminde rol oynamaktadır (2). Bu hastalıkların tedavisinde tirozinaz enzim aktivitesini inhibe edebilen ajanların etkili olduğu gösterilmiştir. Sentetik ilaçların yanı sıra doğal kaynaklı birçok tirozinaz inhibitör etkili bileşik tespit edilmiştir. Polifenolik yapıdaki bileşikler olarak flavonol, flavon, isoflavonoit, kalkon, stilben, kumarin ve benzaldehit türevi bileşikler ile uzun zincir lipitler ve steroidler bunlara örnektir (3).

Birçok sentetik de doğal kaynaklı bileşiğin tirozinaz inhibitör aktivite potansiyeline sahip olduğu gösterilmiş olsa da kullanımları güvenlik sınırları nedeniyle kısıtlı kalmaktadır; örneğin cilt beyazlatıcı ürünler içerisinde en fazla reçetelenenlerden biri olan 1,4-dihidrokinon yüksek aktiviteye sahip olsa da mutajenik yan etkileri sebebiyle birçok ülkede yasaklanmıştır. Cilt beyazlatıcı ve güneş lekelerine yönelik ürünlerde en fazla tercih edilen etken maddeler olarak kojik asit ve arbutin ise mevcut kullanımları sürdürülmesine karşın sitotoksitelerinin yüksek olması ile oksijen ve su varlığındaki düşük stabiliteleri nedeniyle halen alternatifleri aranan bileşiklerdir. Bu sebeplerden dolayı kozmetik ve ilaç endüstrisi açısından doğal kaynaklı bileşiklerin tirozinaz inhibitör aktivite sunma potansiyelleri büyük önem taşımaktadır (4).

elde edilen mulberozit A bileşiminin IC₅₀ değeri 1,29 µM (11) olarak bulunmuştur. *Morus alba* L. kök kabuklarından elde edilen makturin (58,4 mg/g) ve morin (20,8 mg/g) bakımından zengin ekstraların 60 µg/mL konsantrasyonda %62 tirozinaz inhibitör aktivite sağladığı tespit edilmiştir (12). Ayrıca farklı bitkilerden elde edilen flavonoit yapısındaki moleküller kersetin (IC₅₀: 0,07 mM), kemferol (IC₅₀: 0,23 mM) ile flavonoit bakımından zengin fraksiyonun da (200 µg/mL %80 inhibisyon) tirozinaz inhibitör aktivite potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (13-15).

Ülkemizde özellikle Batı Anadolu'da İzmir, Ödemiş, Tire hattı ile Balıkesir, Konya, Antalya, Sivas, Gaziantep civarlarında geniş yayılışı bulunan ve ekonomik değeri sebebiyle, kültürü yapılmakta olan *Morus nigra* L. bitkisinin (16) meyvelerinin içerisinde bulunan antosiyanin türevi moleküller ile tirozinaz inhibitör aktivite sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bitkisel droglardan etken madde eldesi, ekstraksiyon işlemleri yoluyla gerçekleştirilmektedir. Özellikle fenolik yapılu bileşiklerin ekstraksiyonunda organik çözücü kullanımını temel alan konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır. Drog ve çözücü arasındaki etkileşimi arttırmak amacıyla da orbital çalkalayıcı ve ultrasonik banyo gibi donanımlardan faydalanılmaktadır. Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılacak çözücülerde sekonder metabolitleri çözebilme, ekstraksiyon sonrası kolay uzaklaştırılma gibi temel özellikler aranmaktadır. Ayrıca inert, nontoksik, yanıcı ve patlayıcı olmayan ile yan ürünlerin oluşumuna sebep olmayan, fitalat ve farklı safsızlıkları barındırmayan yapıda olması gerektiği belirtilmiştir (17).

Organik çözücü kullanımını azaltan/ortadan kaldıran ileri ekstraksiyon teknolojileri, kaynakların etkin ve verimli kullanımı ile insan ve çevre sağlığının korunmasına yönelik fayda sağlamaktadır. Ekstraksiyon işlemlerine etki eden birçok parametre bulunması sebebiyle ileri ekstraksiyon sistemleri gelişmeye açık alanlardır. Ekstraksiyon işlemleri için kullanılan enerji, çözücü, süre, hammadde miktarlarının azaltılmasının yanısıra biyoaktif bileşenlerin eldesine yönelik olarak yüksek verim ve seçicilikte sistemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca konvansiyonel çözücü ekstraksiyonu teknikleriyle elde edilenlerden farklı kompozisyona sahip ekstraların eldesi bu sistemlerin ekstraksiyon ortamı açısından sağladıkları yüksek difüzyon hızı, seçicilik, çözme gücü ve düşük viskozite etkisi sayesinde mümkün olabilmektedir (18, 19).

Bu çalışmada, *Morus nigra* meyvelerinden tirozinaz inhibitör etkili antosiyanince zengin ekstre eldesinin araştırılması amacıyla süperkritik

karbondioksit, subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemlerinin optimizasyon çalışmalarının yürütülmesi planlanmıştır. Optimizasyon çalışmasından elde edilecek veriler ışığında endüstriyel üretim ve büyük ölçekli çalışmalara kaynak sağlanmasına yönelik olarak antosiyanince zengin farklı bitkisel kaynaklar olan zirai kültür formları *Raphanus sativus* 'Red Meat' kök ve *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* topraküstü kısımları ile optimum koşullarda ekstraksiyonlar yürütülecektir. Süperkritik akışkan teknolojileri sayesinde sıvı fazın çözme ve yoğunluk gücü ile gaz fazın difüzyon hızı biraraya getirilerek ileri bir ekstraksiyon sistemi oluşturulabilmektedir. Hedeflenen farklı özelliklere sahip biyoaktif bileşenlerin eldesi oksijen, ışık ve yüksek sıcaklık kaynaklı bozulmalardan korunarak, yüksek miktarda çözücü tüketimi ve uzun ekstraksiyon süreleri olmaksızın, yüksek seçicilik ile sağlanabilmektedir (18-20). Ayrıca inert, nontoksik, ağır metal ve çözücü kalıntısı olmaksızın, atık bırakmayan yapısı itibarıyla süperkritik akışkan sistemleri ile polifenollerin eldesi sanayi açısından en çok gelecek vaat eden sistem olarak tanımlanmıştır (18). Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri konvansiyonel sistemlere kıyasla kısa işlem süresi, düşük çözücü tüketimi, yüksek verim ve seçicilik sağlayabilmektedir. Yöntem geri kazanımı ve tekrarlanabilirliği açısından daha iyi sonuçlar gösterilmiştir. Daha düşük maliyetler ile içerikte bulunan bileşiklerin degradasyonunda azalma sağlanmasına ilave olarak işlem kaynaklı kontaminasyonda ve ilave temizleyici basamaklara duyulan ihtiyaçta azalma sunması yönlerinden daha faydalı bulunmuştur. Isıtıcı kaynak olarak mikrodalga destekli sistemlerin kullanımı laboratuvar pratiği açısından uluslararası organizasyonlar tarafından onaylanmış bir standart analitik sistem haline dönüşmektedir (21).

Bu doktora tezi kapsamında *Morus nigra* L.'nin önemli bir yayılış alanı olan İzmir Tire'den temin edilen meyve drogları ile ileri ekstraksiyon teknolojileri olarak tanımlanan süperkritik karbondioksit, subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemlerinin optimizasyonu, elde edilen ekstraktların spektrofotometrik olarak toplam fenol, flavonoid ve antosiyanin miktar tayinleri ile UPLC-DAD-ESI-MS/MS ile antosiyaninlerin kalitatif-kantitatif analizi yapılarak tirozinaz inhibitör aktivite potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir. Tespit edilen sonuçlar konvansiyonel ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışma ile elde edilecek veriler sayesinde ileri ekstraksiyon teknolojileri kullanılarak floramızda var olan antosiyaninler bakımından zengin diğer bitkisel kaynakların da değerlendirilmesi ve ülkemiz ekonomisine katkıda bulunabilmesi sağlanabilecektir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. MORACEAE FAMILİYASI

Moraceae familyası tek veya iki evcikli, süt taşıyan, herdem yeşil veya yaprak dökken ağaç, çalı ve nadiren otsu bitkilerden oluşmaktadır. Yapraklar basit veya palmat loblu, alternan dizilişli ve nadiren karşılıklıdır. Çiçekler genellikle kimoza durumlarda, tek eşeylidir. Perigon 2 dairede dizilmiştir. Tepaller serbest veya birleşiktir. Erkek çiçekte tepaller 4 (bazen 2-6) adettir ve stamenler 2-4 adet olarak tepallerin önünde bulunur. Dişi çiçekte tepaller 4 adet, ovaryum üst veya alt durumlu, tek lokuluslu, iki karpelli ve bir ovüllüdür. Plasentasyon apikaldir. Meyve drupa, nuks veya etli bir reseptakulum içinde aken tiptedir. Tek meyveler kendi aralarında veya perigon ya da reseptakulum ile birleşerek çeşitli şekillerde olabilen bileşik meyveleri oluştururlar (23).

Genellikle tropiklerde ve nadiren subtropiklerde yayılış gösterirler. Kuzey yarımkürede ılımandan subtropik kuşağa ve güney yarımkürede tropik kuşağa kadar, deniz seviyesi ile 4000m aralığında geniş bir yayılış gösterebilmektedir (23, 24).

Moraceae familyası toplam 75 cins ve yaklaşık 3000 tür içermektedir. Ülkemizde 2 cins ve 4 tür ile temsil edilmektedir. Bunlardan *Morus* türlerinin kültürü yapılmakta olup doğallaşmış türler olarak ifade edilmektedirler (22-24).

2.2. MORUS L. CİNSİ

Morus L. tek veya iki evcikli ağaçlardır. Yaprakları almaşık dizilişli, ovatkordat, basit veya loblu, kenarları dişlidir. Erkek ve dişi çiçekler amentum durumundadır. Dişi çiçek durumları kısa saplı ve sık dizilişlidir. Tepallerin etlenerek drupa tipi meyveyi sarması ile bileşik meyve oluşur.

Kuzey yarımkürede ılıman ve subtropik bölgelerde yayılış gösterir ve 24 tür ile 100'den varyete içerir. 400 yılı aşkın süredir *Morus* türlerinden ülkemizde *Morus alba* (%95), *Morus rubra* (%3) ve *Morus nigra* (%2) olarak 3 türün kültürü yapılmaktadır ve çoğunlukla doğallaşmış türlerdir (22, 23, 25).

Morus L. cinsinin sistematik durumu Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası'na göre aşağıda belirtilmiştir (22).

Bölüm:	Spermatophyta
Altbölüm:	Angiospermae
Sınıf :	Dicotyledoneae (Magnoliopsida)
Altsınıf:	Hamamelidae
Takım:	Urticales
Aile :	Moraceae
Genus :	<i>Morus</i> L.

2.2.1. *Morus* türleri ile ekstraksiyon ve analiz çalışmaları

Morus alba ve *Morus rubra* gibi farklı *Morus* türleri ile ekstraksiyon ve analiz çalışmaları yürütülmüştür.

Morus alba yaprak droğu ile yürütülen bir çalışmada yanıt yüzey metodolojisinden faydalanarak 1-deoksinojirimisin ekstraksiyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yaprakta bulunan 1-deoksinojirimisin miktarının %0.1 düzeyinde olması sebebiyle daha etkin ekstraksiyon sistemlerinin geliştirilmesi ihtiyacına yönelik çalışma dizayn edilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sisteminde ekstraksiyon çözgeninde yer alan etanol oranı, drog:çözücü oranı, ultrasonik gücü, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi parametreleri üzerinden 1-deoksinojirimisin ve toplam verim cevapları uyarınca optimizasyon çalışması yürütülmüştür. Drog:çözücü oranı, ultrasonik güç ve ekstraksiyon süresi parametrelerinin anlamlı etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Optimize edilen koşullar drog:çözücü 1:7, ultrasonik güç 180 watt ve ekstraksiyon süresi 260 sn değerlerindedir. 1-deoksinojirimisin bakımından zengin ekstre (%0,8) eldesi yüksek ekstraksiyon verimi (%98) ile sağlanmıştır (26).

Farklı *Morus* türlerinden antosiyaninlerin eldesine yönelik olarak makropor reçineler kullanılarak saflaştırılması ve miktar tayini çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmada yer alan dut meyveleri Çin'de kültürü yapılmakta olan farklı 31 varyetenin meyveleri arasından seçilmiştir. Meyve ekstrelerinde bulunan toplam antosiyanin miktarı siyanidin-3-glikozit eşdeğeri olarak 147,68 ile 2725,46 mg/L aralığında tespit edilmiştir. Makropor reçineler kullanılarak yürütülen ekstraksiyon ve saflaştırma çalışmaları sonucunda, gıda renklendiricisi olarak dut kaynaklı

antosiyeninlerin eldesinde endüstriyel üretim açısından reçine kullanımı etkili bir yöntem olarak belirlenmiştir. Çalışılan altı farklı tipteki reçine arasında en etkili bulunan X-5 reçinesinin antosiyeninler açısından yüksek adsorban (91 mg/mL resin) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Reçinelerin adsorbsiyon kapasitelerinin yüzey alanı ve por çapı ile arttığı tespit edilmiştir. Antosiyeninlerin ekstraksiyonu sonrası kalan meyve suyu kısmının, içeriğindeki besin öğeleri ile yeni araştırmalara kaynaklık edebileceği belirtilmiştir (27).

Morus rubra meyvelerinin kimyasal kompozisyonu YBSK ile belirlenmiş, antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. Meyvelerin kuru madde miktarı, toplam asidite, toplam şeker, indirgen şeker, ham protein, potasyum, kalsiyum, magnezyum, sodyum içerikleri belirlenmiştir. Antioksidan etkiden sorumlu olan askorbik asit, toplam fenol ve toplam antosiyenin miktar tayinleri yapılmıştır. Meyvelerde bulunan antosiyenin molekülleri (siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3,5-diglikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit, peonidin-3-glikozit) izole edilerek YBSK ile analiz edilmiş; başlıca antosiyenin bileşiğinin siyanidin-3-glikozit olduğu belirlenmiştir (28).

Morus alba meyvelerinden %95 etanol : %0.1 HCl (1:1) sistemi ile oda sıcaklığında, 4 saat süre ile karanlıkta ekstraksiyon gerçekleştirilerek C18 kolon ile antosiyeninlerin izolasyonu yapılmıştır. UV spektrometre, YBSK-PAD, LC-MS ve NMR ile izole bileşenlerin yapıları tayin edilmiştir. Tespit edilen başlıca antosiyeninlerin siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit olduğu belirlenmiştir (29).

Morus alba meyvelerinden antosiyeninlerin ultrasonik destekli ekstraksiyonu yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak optimize edilmiştir. Liyofilize edilen meyvelerin ekstraksiyonunda optimizasyon parametreleri olarak antosiyenin verimi, drog:çözücü oranı, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi çalışılmıştır. Elde edilen ekstrelerde YBSK-DAD ile siyanidin-3-glikozit ve siyanidini-3-rutinozit tayinleri gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücü karışımının %63,8 metanol (%1 TFA) olduğu, 43,2 °C ekstraksiyon sıcaklığı, 8:23 drog:çözücü oranı ve 40 dk ekstraksiyon süresi optimum koşullar olarak tespit edilmiştir (7).

Morus alba, *Morus atropurpurea*, *Morus australis* ve *Morus nigra* ile yürütülen çalışmada bitkilerin meyve suyu, meyve ve yapraklarında bulunan 1-deksinojirimisin, resveratrol, oksiresveratrol, siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-

rutinozit ve rutin miktarları YBSK-DAD ile belirlenmiştir. *Morus nigra* flavonoit türevi bileşikler açısından en zengin tür olarak tespit edilmiştir (30).

2.2.2. *Morus* türleri ile aktivite çalışmaları

Morus alba yaprakları ile gerçekleştirilen bir çalışmada yapraklarda bulunan 1-deoksinojirimisin molekülünün α -glukosidaz inhibitör aktivitesi aracılığı ile insanda kan şekeri seviyelerinin düşürülmesinde fayda sağladığı belirlenmiştir. 1-deoksinojirimisin bakımından zengin yaprak ekstresinin insan plazma lipit düzeyleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. On katılımcı ile gerçekleştirilen çalışmada trigliserit seviyeleri 200 mg/dl seviyesi üzerinde olan bireyler yer almıştır. 12 hafta boyunca günde 3 kez, 12 mg yaprak ekstresi içeren kapsüller çalışmaya katılanlar tarafından yemek öncesinde alınmıştır. Lipoprotein ve trigliserit düzeylerinde orta etki tespit edilmiştir. Hematolojik veya biyokimyasal parametreler üzerinde belirgin bir değişim gözlenmemiş ve 1-deoksinojirimisin bakımından zengin yaprak ekstresi kullanımına bağlı yan etki tespit edilmemiştir (31).

Morus alba meyvelerinde bulunan antosiyaninlerin, Zucker diyabetik şişman sıçanlarında diyabete karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Meyvelerde bulunan antosiyanin kompozisyonunun tayini ile antosiyanince zengin ekstrelerin kan glukoz ve insülin seviyeleri üzerine etkisi erkek, leptin reseptörü bulunmayan, Zucker tipi sıçanlar üzerinde çalışılmıştır. LC-MS ile yapılan analizler ile ekstrelerin içeriğinde bulunan antosiyaninler tayin edilmiştir. 5 hafta süreyle günde iki kez 125 ve 250 mg antosiyanin/kg ağırlık dozunda sıçanlara verilmiştir. Karboksimetilselüloz verilen sıçanlara kıyasla antosiyanince zengin meyve ekstresi verilen sıçanlarda glukoz düzeylerinde belirgin oranda düşük kaldığı tespit edilmiştir. Histolojik bulgular 250 mg/kg dozda antosiyanince zengin ekstre verilen sıçanlarda, karboksimetilselüloz verilen sıçanlara kıyasla pankreas adacıklarında dejenerasyonu önlendiğini göstermiştir (32).

Morus alba, *Morus atropurpurea* ve *Morus bombycis* türlerinin dallarından elde edilen ekstre, fraksiyon ve oksiresveratrol molekülünün antienflamatuvar etkisi ve etki mekanizması araştırılmıştır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrelerin içerik tayinleri GC-MS ile gerçekleştirilmiştir. *Morus alba* içeriğinde bulunan oksiresveratrol bileşiğinin aynı zamanda kemotaksonomik olarak tür tayininde yarar sağladığı belirlenmiştir. *Morus alba* butanol ve su ekstresi aktivite

göstermemiş, etil asetat fraksiyonu ile oksiresveratrol bileşiğinin antienflamatuvar etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (33).

Morus alba meyvelerinden HSCCC yöntemi (high speed counter-current chromatography) ile izolasyon çalışması yapılmış ve siyanidin temelli 5 antosiyanin türevi elde edilmiştir. Moleküllerin yapı tayinleri NMR ve ESI-MS ile gerçekleştirilmiştir. DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri saptanmıştır. Meyve ekstresinin antioksidan aktivitesi askorbik aside eşdeğer bulunarak izole moleküllerden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (34).

Farklı 11 *Morus alba* genotipinin meyveleri ile yürütülen bir çalışmada UPLC-MS/MS ile 14 hidroksisinnamik asit türevi, 13 flavonol türevi ve 14 antosiyanin türevi bileşiğin analizi sağlanmıştır. Meyve ekstralarının toplam fenol miktar tayinleri ve serbest radikal süpürücü, metal bağlayıcı, ferrik iyon indirgen ve süperoksit anyon radikali süpürücü etkileri belirlenmiştir. Sonuçlar uyarınca içerikte bulunan polifenolik yapıli bileşiklerin güçlü süperoksit anyon radikali süpürücü aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (5).

2.3. MORUS NIGRA L. TÜRÜ

Morus nigra L. boyu 10 m'ye ulaşan, kısa gövdeli ve geniş yuvarlak taca sahip ağaçlardır. Yaprakları ovat, 6-20 cm aralığında, uçta akut veya akuminat, tabanda derin kordat, kenarları kaba dişli, genelde parçalanmamış ya da bazen 2-3 loblu, koyu yeşil renkte, üst yüzeyi pürüzlü ve alt yüzü tüylüdür. Yaprak sapı 1,5,-2,5 cm ve meyveleri 2-2,5 cm arasındadır. Meyvesi siyahımsı mor renktedir. Diğer türlerden ayırımı sağlayan karakteristik özellikleri yaprak üst yüzeyinin pürüzlü, alt yüzeyinin tüylü ve lamina tabanının derin kordat olması, meyve sapının sapsıza yakın olması ve meyvelerinin siyahımsı mor veya siyah renkte olmasıdır (Resim 1). Bu özellikleri ile diğer türlerden ayırt edilebilmektedir (16, 22, 23).



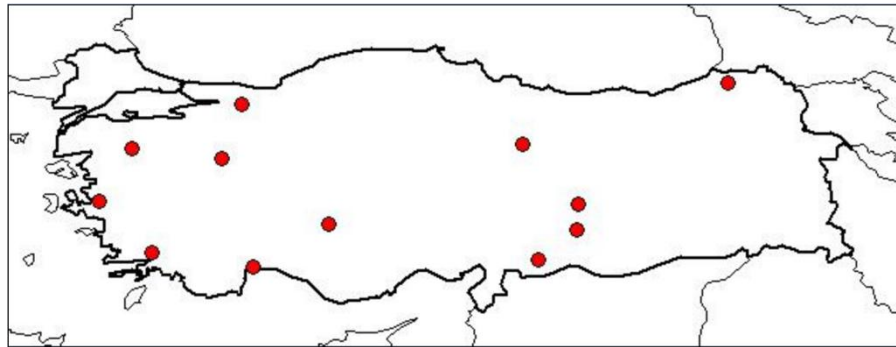
Resim 1. *Morus nigra* L.

(35)

2.3.1. *Morus nigra* L. Dünyada ve Türkiye’de Yayılışı

Anavatanı İran (güneybatı Asya, Transkafkasya Bölgesi) olup Akdeniz bölgesi, güney Avrupa ve güneydoğu Amerika’da doğallaşmıştır (36).

Ülkemizde Balıkesir (Bandırma), Sakarya (Geyve), Çoruh (Peterek), İzmir (Ödemiş), Kütahya (Emet), Konya (Meram), Sivas (Gürün), Malatya (Pötürge), Muğla (Yeşilyurt), Antalya (Kumluca), Gaziantep (Dutluk) ve Adıyaman (Besni) civarlarında yayılışı (Şekil 2) bulunmaktadır (16).



Şekil 2. *Morus nigra* Türkiye’de yayılışı

(37)

2.3.2. *Morus nigra* L. Genel Kimyasal Özellikleri

Morus nigra bitkisinde bulunan başlıca biyoaktif bileşenler olarak organik asitler, fenolik asitler, flavonoidler ve antosiyanin yapıları bileşikler belirtilmiştir. *Morus* türleri arasında *Morus nigra* meyvelerinin toplam fenol ve flavonoid miktarları açısından 1422 mg GAE/g taze meyve ve 276 mg KE/100 g taze meyve değerleri ile en yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Meyvelerin toplam yağ miktarı %0,95 olarak tespit edilmiş ve başlıca yağ asitlerinin linoleik asit, palmitik asit, oleik asit ve stearik asit olduğu belirlenmiştir. 21,8 mg/100mL askorbik asit taşıdığı tespit edilmiştir (38, 39). Bileşiminde bulunan diğer organik asitlerin malik, tartarik, sitrik ve süksinik asit olduğu belirlenmiştir (40). *Morus nigra* meyve ve yapraklarında 1-deoksinojirimisin, resveratrol, oksiresveratrol, siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit bulunduğu belirlenmiştir (30). Başlıca diğer fenolik bileşikler olarak gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit tespit edilmiştir (40). Meyvelerinde bulunan başlıca flavonoid türlerinin kersetin-3-O-glikozit, kersetin-3-O-rutinozit ile kemferol-3-O-rutinozit olduğu ve antosiyanin türevi olarak siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit bulunmuştur (41).

2.3.3. *Morus nigra* L. Tıbbi Amaçlı Kullanımı

Morus nigra meyvelerinden şeker ile beraber kaynatılarak hazırlanan şurubun (Syrupus Mori) gargara olarak özellikle çocuklarda pamukçuk olmak üzere ağız ve boğaz hastalıklarında kullanıldığı belirtilmiştir (22, 42). Meyvelerin aynı zamanda böbrek hastalıklarına karşı antiinflamatuvar ve diüretik etkiye yönelik olarak ve ekspektoran amaçlı kullanıldığı bildirilmiştir (43). Diş hastalıkları, diyabet, hipertansiyon, artrit ve anemiye karşı kullanımları da kaydedilmiştir (44). Yapraklarının diyaforetik, astrenjan ve hipoglisemik amaçlı kullanımı belirtilmiştir (45). Gövde ve kök kabuklarının (Cortex Mori nigrae) ise suda kaynatıldıktan sonra sabahları aç karnına içilerek müshil ve tenya düşürücü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yapraklarının ise şeker hastalığına karşı kullanıldığı bildirilmiştir (22, 42, 46).

2.3.4. *Morus nigra* L. Ekstraksiyon ve Analiz Çalışmaları

Morus nigra türü ile gerçekleştirilmiş olan ekstraksiyon ve analiz çalışmaları özet halinde sunulmuştur.

Kuzeydoğu Anadolu, Çoruh Vadisinde yetişen 5 *Morus nigra* genotipi ile yürütülen çalışmalarda fiziko-kimyasal özellikleri incelenmiştir. Yaprak rengi, aya şekli, ağacın büyüme yönü ve dallanma yönü incelen fenotipik özellikler arasındadır. Kimyasal olarak ise meyvelerde yağ asidi kompozisyonu, meyve rengi ve ağırlığı, su verimi, toplam çözüner madde miktarı, pH ve organik asit kompozisyonu ile askorbik asit ve toplam fenol miktarları belirlenmiştir. GC-MS ile meyve içeriğinde bulunan başlıca yağ asitlerinin linoleik asit (%58,36), palmitik asit (%14,33) ve oleik asit (%11,33) olduğu tespit edilmiştir. Toplam fenol miktarlarının 1,94-2,23 mg GAE/g taze meyve aralığında ve askorbik asit miktarlarının 14,9-18,7 mg/100 mL aralığında olduğu belirlenmiştir. Organik asitler olarak ise başlıca malik asit (123-218 mg/g) ve sitrik asit (21-41 mg/g) bulunduğu saptanmıştır (47).

Van ili çevresinde yetişen *Morus nigra*, *Morus alba* ve *Morus rubra* meyveleri ile yürütülen çalışmada organik asit, fenolik bileşen, şeker, askorbik asit içerikleri ve antioksidan aktiviteleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Tüm örneklerde bulunan başlıca organik asit olarak malik asit (1,32-4,47 g/100 g taze meyve) ve sitrik asit (0,39-1,08 g/100 g taze meyve) belirlenmiştir. Fenolik bileşenler olarak klorojenik asit (0,12-3,11 mg/g taze meyve) ve rutin (0,85-1,42 mg/g taze meyve) tespit edilmiştir. Glukoz miktarları 6,07-7,75 g/100 g taze meyve ve askorbik asit miktarı 11,30-24,42 mg/100 g taze meyve olarak saptanmıştır (40).

Slovenya'da yetişen birçok doğal ve kültür bitkisi ile yürütülen bir çalışmada *Morus nigra* meyvelerinin antosiyanin kompozisyonu araştırılmıştır. Meyvelerin ekstraksiyonlarında metanol kullanılmış, analizler LC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir. Meyve ekstrelerinde saptanan başlıca antosiyanidinler siyanidin (%91,5), pelargonidin (%8,5) ve delfinidin (%0,2) olarak tespit edilmiştir. Siyanidin-3-glukozit miktarı 1,56 mg/g, pelargonidin-3-glikozit miktarı 0,12 mg/g ve delfinidin-3-rutinozit miktarı 0,002 mg/g olarak saptanmıştır (48).

Erzurum, Olur civarında yetişen *Morus nigra*, *Morus alba* ve *Morus rubra* meyvelerinin kimyasal kompozisyonu üzerine araştırmalar yürütülmüştür. En yüksek toplam fenol ve flavonoit miktarları *Morus nigra* meyvelerinde 1422 mg GAE/100 g taze meyve ve 276 mg KE/100 g taze meyve değerleri ile saptanmıştır. Toplam yağ oranları *Morus alba* %1,10, *Morus nigra* %0,95 ve *Morus rubra* %0,85 olarak tespit edilmiştir. Başlıca yağ asitleri olarak linoleik asit, palmitik asit ve oleik asit saptanmıştır. Meyvelerin toplam çözüner madde, asidite, pH, askorbik asit miktarı ve mineral kompozisyonları da tespit edilmiştir (39).

İtalya, Benevento civarında yetişen *Morus nigra* meyveleri üzerinde izolasyon çalışmaları yürütülmüş ve elde edilen bileşikler YBSK-DAD-MS ve NMR ile tayin edilmiştir. Kalitatif ve kantitatif analizler sonucunda meyvelerde bulunan antosiyaninler siyanidin-3-glikozit (1,79 mg/g taze meyve), siyanidin-3-rutinozit (0,75 mg/g taze meyve) pelargonidin-3-glikozit (0,12 mg/g taze meyve) ve pelargonidin-3-rutinozit (0,04 mg/g taze meyve) olarak; flavonoit türevi diğer bileşikler ise kersetin-3-rutinozit (3,29 mg/g taze meyve), kersetin-3-glikozit (0,34 mg/g taze meyve) ve kemferol-3-rutinozit (0,15 mg/g taze meyve) olarak tespit edilmiştir (41).

Isparta civarında yetişen *Morus nigra* meyvelerinin organik asit kompozisyonunun araştırıldığı çalışmada YBSK-DAD ile analizler yürütülmüş, malik asit (198,50 mg/g), sitrik asit (15,50 mg/g), tartarik asit (4,20 mg/g), oksalik asit (0,34 mg/g) ve fumarik asit (0,02 mg/g) miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir (43).

Morus nigra meyvelerinde bulunan antosiyaninlerin YBSK-DAD-MS ile analizine yönelik olarak yürütülen çalışmada 5 farklı antosiyanin türevi tespit edilmiştir. Bunların siyanidin-3-soforozit, siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit olduğu saptanmıştır (49).

2.3.5. *Morus nigra* L. Aktivite Çalışmaları

Güneydoğu Sırbistan'da yetişen *Morus nigra* meyvelerinden elde edilen ekstrelerin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Etanol, etanol:su (50:50) ve su ekstreleri ile spektrofotometrik olarak toplam fenol, flavonoit ve antosiyanin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda 90,26-118,84 mg GAE/100 g taze meyve toplam fenol miktarı, 114,83-128,68 mg siy-3-gliE/100 g taze meyve toplam antosiyanin miktarı değerlerine ulaşılmıştır. Etanol:su (1:1) ile elde edilen meyve ekstrelerinin antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi ile %71,41, su ekstrelerinin ABTS yöntemi ile %55,43 (Trolox eşdeğeri olarak) olarak bulunmuştur (44).

Çoruh Vadisinde yetişen dört *Morus nigra* genotipine ait meyvelerin antioksidan aktiviteleri çalışılmış ve kimyasal içerikleri belirlenmiştir. Meyvelerin askorbik asit (22,60 mg/100 mL), toplam antosiyanin (0,78mg siy-3-gliE/g) ve toplam fenol miktar (2,48 mg GAE/g) tayinleri yapılmıştır. Antioksidan aktiviteleri DPPH ve FRAP yöntemleri ile 21,17 µmol TE/g ve 14,11 µmol TE/g olarak tespit edilmiştir (50).

Adana, Antakya, Malatya, Giresun ve Erzican'da yetişen *Morus nigra* genotiplerine ait meyveler ile yürütülen çalışmada meyvelerin kimyasal içerikleri belirlenmiş ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Toplam fenol (2,73 mg GAE/g taze meyve) ve toplam antosiyanin (0,57 mg siy-3-gliE/g taze meyve) miktar tayinleri yapılarak organik asit kompozisyonları belirlenmiştir. Malik asit (0,16 mg/100 mL), askorbik asit (0,005 mg/100 mL) ve sitrik asit (1,87 mg/100 mL) miktarları tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite tayininde TEAC ve FRAP yöntemleri kullanılmıştır. TEAC sonucunda 14,4 µmol TE/g taze meyve ve FRAP sonucunda 16,9 14,4 µmol TE/g taze meyve olarak antioksidan aktivite değerlerine ulaşılmıştır (51).

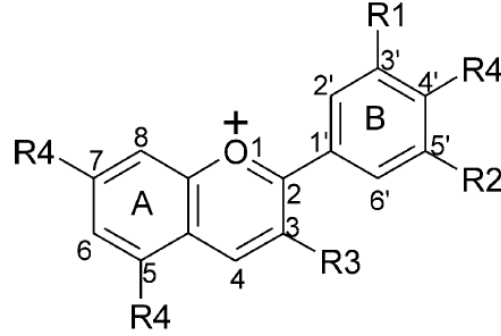
Morus nigra meyvelerinden üç farklı yöntem ile elde edilen meyve suyu, hidroalkolik ve polifenolik ekstrelerin insan eritrositleri ve sıçan karaciğer hepatositleri üzerine peroksidatif hasarı önleyici ve insan LDL düzeyleri üzerine etkisi incelenmiştir. Hidroalkolik ekstrelerin hemoglobin glikolizasyonu üzerine belirgin önleyici aktivitesi bulunurken, meyve suyunda aktivite saptanamamıştır. İnsan eritrositlerinde hemolize karşı ise tüm ekstreler belirgin aktivite göstermiştir. Ekstrelerde bulunan biyoaktif bileşiklerin antioksidan mekanizmalar yoluyla hastalıklara karşı etki gösterdikleri saptanmıştır (52).

Morus nigra yapraklarının sulu ekstreleri ile diyabetik sıçanlar üzerinde yürütülen çalışmada maternal-fetal sonuçlar, oksidatif hasar durumu ve lipit düzeylerinde değişimler incelenmiştir. Yirmi gün süre ile sıçanlara 400mg/kg dozda yaprak ekstresi uygulanmış ve maternal-fetal sonuçlar araştırılmıştır. Diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlar arasında glisemik olarak değişiklik tespit edilmemiştir. Bitki ekstresi alan diyabetik sıçanlarda almayanlara kıyasla kolesterol, trigliserit düzeylerinde düşüş, plasental indeks ve ağırlıkta düşüş saptanmış, fetuslarda daha düşük oranda iskelet ve iç organ anomalileri saptanmıştır. Hiperglisemiye karşı ise diyabetik sıçanlarda olumlu sonuç alınmamıştır (53).

2.4. ANTOSİYANİNLER

Antosiyanin kelimesi Yunanca *anthos* (çiçek) ve *kyanos* (mavi) kelimelerinden türetilmiştir. Suda çözünebilen bitki pigmentleri arasında en geniş gubu temsil etmektedir. Fenolik yapıdaki sekonder metabolitler içerisinde flavonoit grubu altında

yer almaktadırlar. Birçok bitki dokusundaki mavi, mor ve kırmızı renkten sorumludurlar. Hayvanlar açısından çekiciliği arttırarak polen taşıma ve tohumların dağılmasında rol almanın yanısıra ultraviyole kaynaklı hasara ve mikrobiyal enfeksiyonlara (fitoaleksin) karşı koruyucu etki göstermeleri bitkiler için önem taşımaktadır (54, 55).



2-fenilbenzopirilyum (flavilyum katyonu)

	R1	R2	R3	R4
siyanidin	OH	H	OH	OH
pelargonidin	H	H	OH	OH
delfinidin	OH	OH	OH	OH

Şekil 3. Antosiyanidin yapısı

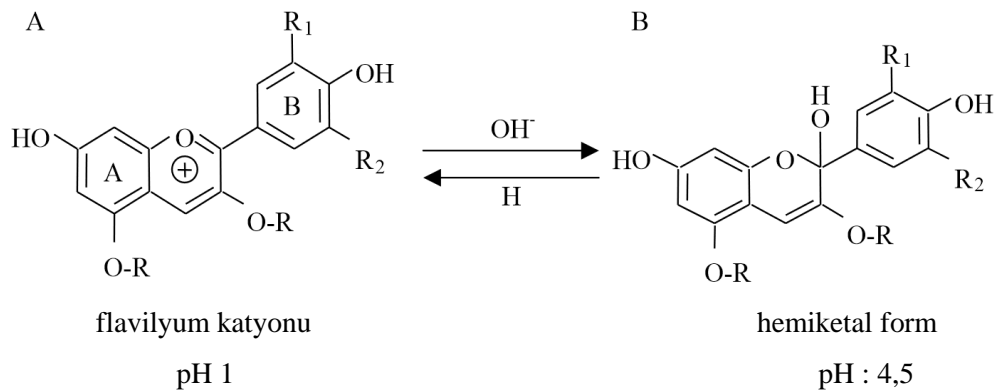
(54)

Antosiyaninler, 2-fenilbenzopirilyum çekirdeğe sahip polihidroksi ve polimetoksi türevlerinin glikozitleridir (Şekil 3). Aglikon kısım antosiyanidin olarak adlandırılır ve glukoz, galaktoz, fruktoz gibi farklı şeker türevlerinin C3, C5 veya C7 pozisyonunda bağlanması ile antosiyanin yapısı meydana gelmektedir. Antosiyaninler arasındaki temel fark yapıya bağlı hidroksil grubu sayısı, şekerin türü ve sayısı ile yapıdaki şekere bağlı alifatik ve aromatik asit sayısıdır. Antosiyanidin yapısına bağlanan şeker türevleri suda çözünübilirliği sağlamaktadır. Bugüne kadar 17 farklı antosiyanidin molekülü tanımlanmıştır. İletim demetli bitkilerde en çok bulunan antosiyanidinler pelargonidin, peonidin, siyanidin, malvidin, petunidin ve delfinidindir. Siyanidin (turuncu-kırmızı), pelargonidin (turuncu) ve delfinidin (mavi-kırmızı) doğada en yaygın bulunanlardır ve yaprakta bulunan pigmentlerin %80'ini, meyve pigmentlerinin %69'unu ve çiçek pigmentlerinin %50'sini oluşturmaktadır.

Doğada tespit edilen antosiyanin sayısı 600'ün üzerindedir. En fazla bulunan antosiyanin molekülü ise siyanidin-3-glikozittir (54).

Antosiyaninlerin polar çözücülerde çözünürlüğü yüksektir. Bu sebeple az miktarda hidroklorik asit veya formik asit içeren metanol gibi çözücüler ile ekstre edilebilirler. Çözücü karışımında bulunan asit pH'yi düşürerek antosiyanin yapısının bozulmasını engeller. Ancak ekstraksiyon sonrası çözücünün uçurulması esnasında metanolün uzaklaştırılması ile yükselen hidroklorik veya formik asit konsantrasyonu da antosiyanin yapısında bozulmaya sebep olmaktadır (54).

Ortam pH'sine bağlı olarak antosiyaninler renk değiştirmektedir. Düşük pH'de pembe, nötr pH'de mor, bazik ortamda yeşil-sarı renk vermekte ve yüksek alkali ortamlarda renksiz dönmektedirler. Bu değişim yapının iskeletini oluşturan flavilyum iyonundaki yük değişimine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Ortam pH'sindeki yükselme ile birlikte antosiyaninlerin flavilyum yapısı hemiketal forma dönüşür ve renk değişimi meydana gelir (Şekil 4). Antosiyaninlerin miktar tayinlerinde bu özelliklerinden faydalanılır. pH 1 ve pH 4,5 tamponlar kullanılarak seyreltilen örnekler üzerinde yapılan spektrofotometrik ölçümler sayesinde solüsyon içerisinde yer alan antosiyanin konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Yapının temeli olan flavilyum katyonu sebebiyle antosiyaninlerin stabilitesi ışık, pH, sıcaklık ve oksijen varlığı gibi faktörlerden yüksek oranda etkilenir ve diğer fenolik bileşiklere kıyasla çok düşüktür (54, 56).



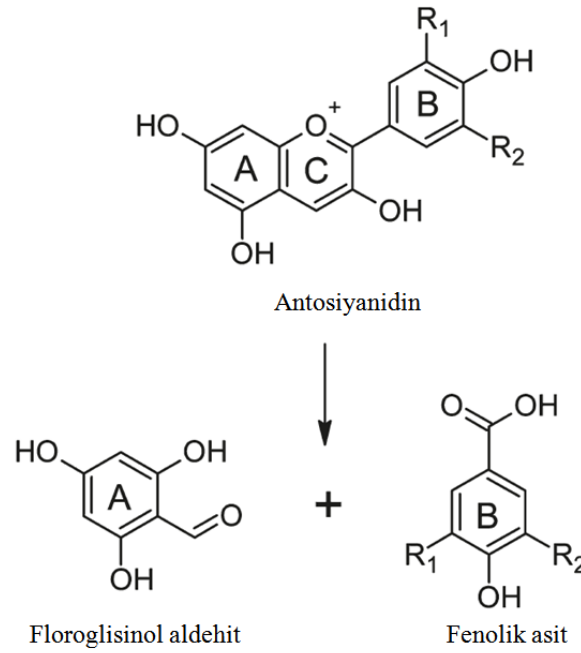
Şekil 4. Ortam pH'sine göre antosiyanidin yapısında değişim

(56)

Antosiyaninlerin biyosentezi şikimat yolağı üzerinden gerçekleşir. Fenilalanin amino asidinden oluşan kumaril-KoA ile asetat yolağından gelen üç molekül malonil-KoA tetrahidrokalkon yapısını meydana getirir. Kalkon izomeraz aracılığı

ile naringenin (flavanon yapısı) oluşumu sonrasında dihidroflavonol ve flavan-3,4-diol oluşumunu takiben antosiyanidin yapısı oluşur. Antosiyanidin yapısına şeker bağlanması ile oluşan antosiyanin yapısı çeşitlilik göstermektedir. En çok görülen C3 pozisyonuna bağlı şeker grubu taşıyanlardır ve bu genellikle glukozdur. Bağlı şekerin hidroksil grubuna sinamik, kafeik ve asetik asit eklenmesi ile daha farklı türevler de oluşur. Biyosentez sonrası antosiyaninler vakuollere taşınarak depo edilir (55).

Birçok araştırmaya konu edilen antosiyaninler antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiobezite, nöroprotektif, antienflamatuvar, kardiyoprotektif ve antikanser aktivite ile geniş bir etkinlik alanına sahiptir. Bazıları halen devam etmekte olan Avrupa ve Amerika'da yürütülen toplam 61 klinik çalışmada antosiyaninlerin metabolik hastalıklar, endokrin hastalıkları ve enflamatuvar hastalıklar üzerine etkisi araştırılmıştır. Düşük yan etki profili ve yüksek aktivite potansiyeline rağmen sağlığa yönelik etkilerini net olarak ortaya koyacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (55).



Antosiyanidin	Fenolik asit	R1	R2
Siyanidin	Protokateşik asit	OH	H
Pelargonidin	4-hidroksibenzoik asit	H	H
Delfinidin	Gallik asit	OH	OH

Şekil 5. Antosiyanidinlerin fenolik asitlere yıkımı

(57)

Antosiyaninler aktivite çalışmaları ile birlikte biyoyararlanım çalışmalarına da konu edilmektedir. Mide ve barsakta emilimlerinin sağlandığı tespit edilmiş olsa da glikozit formlarının biyoyararlanımı aglikona kıyasla daha düşük bulunmuştur. Bu duruma sebep olarak glikozit formun yüksek oranda suda çözünebilme kabiliyeti sebebiyle pasif difüzyon ile taşınımının güç olması, aglikon formun ise daha hidrofobik yapısı sayesinde mukozal epiteli pasif difüzyon ile geçebilmesi gösterilmiştir. Antosiyanin formunda emilim sağlanabilmesi için ise belirli aktif taşıma mekanizmalarına ya da enzimler aracılığı ile ince barsakta aglikon forma hidrolize olmalarının gerektiği belirtilmektedir. Yüksek pH ortamında düşük stabiliteye sahip olmalarına karşın fizyolojik pH'de protokateşik asit gibi fenolik asitlere yıkılarak (57) metabolitleri yoluyla da aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 5). Toksikolojik çalışmalarda ise antosiyanince zengin bitki ekstrelerinin mutajenisite, reproduktif toksisite, teratojenite, akut ve kısa dönem toksisitelerinin değerlendirilmesi sonucunda toksisitelerinin çok düşük olduğu belirlenmiştir (55).

2.5. EKSTRAKSİYON SİSTEMLERİ

2.5.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

Farmasötik anlamda ekstraksiyon bitkisel (ya da hayvansal) dokulardan tıbbi etkiye sahip bileşenler içeren kısımların seçici çözücüler aracılığı ile standart metotlar kullanılarak ayrılması işlemidir. Çözünebilir özellikteki bitkisel metabolitlerin ayrımının sağlandıktan sonra ekstraksiyon çözücüsünün uzaklaştırılması ile kuru ekstre eldesi mümkün olur. Ekstraksiyon yöntemleri, ekstraksiyon işleminde organik çözücü kullanımı açısından, çözücü kullanımını temel alan konvansiyonel metotlar ve çözücü kullanımını sınırlayan/ortadan kaldıran ileri ekstraksiyon teknolojileri olarak tanımlanabilir (17).

Konvansiyonel çözücü ekstraksiyonunda orbital çalkalayıcı ve ultrasonik banyo gibi ekipmanların ekstraksiyon işlemlerinde kullanımının drog çözücü etkileşimine etki ederek kütle transferini arttırmak yoluyla fayda sağladığı saptanmıştır. Çözücü ekstraksiyonunda en önemli avantajın geniş bir aralıkta çözücü polaritesinin ve pH'sinin ayarlanabilmesi olduğu, buna karşın ekstraksiyon çözücüsünün sekonder metabolitleri çözme kabiliyeti, işlem sonrası kolayca uzaklaştırılabilme, inert, nontoksik, kolay yanıcı/patlayıcı olmama, yan ürün

oluşumuna sebep olmama ve fitalat gibi safsızlıkları barındırmama gibi özelliklere sahip olması gerektiği belirtilmiştir (17).

2.5.2. İleri Ekstraksiyon Teknolojileri

Ekstraksiyon işlemlerinde organik çözücü kullanımını temel alan konvansiyonel sistemlere kıyasla kullanılan hammadde, çözücü, zaman ve enerjiden tasarruf etmeyi, verim ve seçicilikte artış sağlamayı ve organik çözücü tüketimini en aza indirmeyi/ortadan kaldırmayı amaçlayan ileri teknoloji ürünü sistemler ileri ekstraksiyon teknolojileri olarak adlandırılmaktadır. Bu sistemlerden süperkritik CO₂, subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri tez çalışmasında yer almıştır. Süperkritik akışkan teknolojilerinde sıvı fazın çözme ve yoğunluk gücü ile gaz fazın difüzivitesi biraraya getirilerek ileri bir ekstraksiyon sistemi oluşturulabilmektedir. Hedeflenen farklı özelliklere sahip biyoaktif bileşenlerin eldesi oksijen, ışık ve yüksek sıcaklık kaynaklı bozulmalardan korunarak, yüksek miktarda çözücü tüketimi ve uzun ekstraksiyon süreleri olmaksızın, yüksek seçicilik ile sağlanabilmektedir. Süperkritik akışkan sistemleri ile gerçekleştirilen ekstraksiyon optimizasyonu çalışmaları sonrası ortaya çıkan sistemler, düşük vizkozite, yüksek seçicilik, difüzivite ve çözme gücünün etkisini ortaya koymaktadır. Ayrıca inert, nontoksik, ağır metal ve çözücü kalıntısı olmaksızın, atık bırakmayan yapısı itibariyle süperkritik akışkan sistemleri ile polifenollerin eldesi sanayi açısından en çok gelecek vaat eden sistemlerden biri olarak tanımlanmıştır (18, 19, 58).

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu sisteminde 31°C-74 bar üzerindeki değerlerde süperkritik alana geçilebilmektedir. Bu bölgede karbondioksit gaz ve sıvı fazın özelliklerini bir arada sergileyerek üstün çözme gücüne erişir. Hedeflenen madde gruplarının ekstraksiyonunun sağlanabilmesi açısından apolar yapıdaki karbondioksit etanol ilavesi yapılmaktadır. %10'a kadar etanol ilaveli sistemler süperkritik karbondioksit sistemleri, %10 üzerinde etanol ilaveli sistemler ise zenginleştirilmiş akışkan sistemleri olarak ifade edilmektedir (59).

Subkritik su ekstraksiyonu açısından 100°C-1 bar ile 374°C-220 bar arasındaki değerler subkritik bölge olarak kabul edilmektedir. Bu aralıkta sağlanan koşullarda suyun sıvı ve gaz fazındaki özellikleri bir araya getirilerek çözme gücünde artış sağlanabilir. Ayrıca yükselen sıcaklıkla beraber düşen dielektrik sabiti değeri ile metanol gibi organik çözücülerin polaritesine yaklaşan su farklı fenolik bileşenleri

daha iyi ekstre edebilir. Bu aşamada kısıtlayıcı nokta yüksek sıcaklık değerlerinin hedef moleküllerin yapısında sebep olabileceği bozulmadır (60).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri konvansiyonel sistemlere kıyasla kısa işlem süresi, düşük çözücü tüketimi, yüksek verimlilik ve seçicilik sağlayabilmektedir. Yöntem geri kazanımı ve tekrarlanabilirliği açısından daha iyi sonuçlar gösterilmiştir. Daha düşük maliyetler ile içerikte bulunan bileşiklerin degradasyonunda azalma sağlamasına ilave olarak işlem kaynaklı kontaminasyonda ve ilave temizleyici basamaklara duyulan ihtiyaçta azalma sunması yönlerinden daha faydalıdır (21, 61).

2.6. TİROZİN AZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE

Tirozinaz yapısında bakır taşıyan ve polifenoloksidaz grubu altında yer alan bir enzim olup melanin biyosentezini katalizlemektedir. Monofenolaz aktivitesi ile tirozin hidroksilasyonu ve difenolaz aktivitesi ile L-dopa oksidasyonu aracılığıyla melanin biyosentezinde rol oynar (3, 4).

Melanin, pigmentler arasında en yaygın bulunanlardan biridir ve bakteri, mantar, bitki ve hayvanlarda tespit edilmiştir. Polifenolikler gibi kompleks bir yapıya sahip olup sarıdan siyaha kadar birçok farklı rengin oluşumundan sorumludur. Memelilerde cilt ve tüy rengini belirleyen başlıca faktörler melanin pigmentlerinin tipi, yoğunluğu ve dağılımıdır. Deride bulunan melanositler tarafından üretilen melaninin temel görevi UV ışınlarına ve reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı korunma sağlanmasıdır. Ancak insanda cilt yüzeyinde düzensiz ve aşırı melanin birikimi sonucunda dermatolojik hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıklara örnek olarak hiperpigmentasyon ve daha ileri safhalarda melanoma gösterilebilir. Özellikle malign melanoma en fazla hayati tehlikeye neden olan deri tümörü olarak tanımlanmaktadır (3, 4).

İnsan beyninin orta beyin bölümünde, dopamin üretiminden sorumlu olarak önemli bir hareket kontrol merkezi olan substansia nigra kısmı bulunmaktadır. Tirozinaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlar aracılığıyla dopaminin dopakinona (yüksek reaktif tür) dönüşümü dopamin kaynaklı nörotoksositeye sebep olmakta ve dopaminerjik nöronlarda bulunan nöromelanin kaynaklı oksidasyon ile sinir hücresi dejenerasyonu meydana gelmektedir. Beyinde oluşan bu hasarlar

sonucunda da Parkinson hastalığı ortaya çıkmaktadır. Tirozinaz inhibitör etkiye sahip bileşenlerin tirozinaz aktivitesini engellemek yoluyla hiperpigmentasyon, melanoma ve Parkinson hastalığına karşı tedavide yer almalarına yönelik birçok çalışmada olumlu sonuçlar elde edilmiştir (2-4, 62).

Tirozinaz inhibitör aktiviteye sahip doğal kaynaklı yeni bileşenlerin ve bu bileşenlerce zengin ekstraktların keşfi, özellikle mevcut bileşiklerin güvenlik sınırları nedeniyle kullanımlarının kısıtlı kalmasından dolayı önem taşımaktadır. Cilt beyazlatıcı ürünlerde en fazla kullanılan ürünlerden biri olan 1,4-dihidrokinon yüksek aktiviteye sahip olsa da mutajenik yan etkileri sebebiyle birçok ülkede yasaklanmış durumdadır. Kojik asit ve arbutin cilt beyazlatıcı ve güneş lekelerine karşı olan etkileri ile birçok üründe yer alsa da yüksek sitotoksiteleri ve oksijen ile su varlığındaki düşük stabiliteleri nedeniyle halen alternatifleri aranan bileşiklerdir. Bu sebeplerden dolayı tirozinaz inhibitör etkili doğal kaynaklı bileşenlerin eldesine yönelik araştırmalar artarak sürmektedir (4).

BÖLÜM 3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 KULLANILAN GEREÇLER

- Evaporatör (Heidolph Laborota-4000)
- Hassas terazi (OHAUS Adventurer AR 3130)
- Isı tabancası (Bosch PHG 630 DCE)
- LC-MS/MS sistemi
 - UPLC-DAD (Thermo-Scientific Accela 1250)
 - ESI-MS/MS (Thermo-Scientific TSQ Quantum Access Max Triple Quadrupole)
- Liyofilizatör (Labconco Freezone 6 Freeze Dry System)
- Mekanik öğütücü (Waring HGB2WT blender)
- Mikrodalga ekstraksiyon sistemi (Sineo MDS-8G)
- Mikropilaka Okuyucu (Thermo-Scientific Varioskan Flash)
- Vakum manifoldu (Alltech 16 girişli KFE manifoldu)
- Vakum pompası (KNF Laboport N810-3FT-18)
- Ultrasonik su banyosu (Bandelin-Sonorex RK-514 BH)
- UV lambası 254/366 nm (CAMAG)
- Orbital çalkalayıcı (IKA Werke OS 10C)
- Soğutucu -80 C (Nuair Glacier Ultra-low Temperature Freezer)
- Subkritik su ekstraksiyon sistemi (Amar Equipments SS-316, 100 mL)
- Süperkritik CO₂ ekstraksiyon sistemi (Thar Design SFE-100)
- Vakum konsantratör sistemi
 - Vakumlu santrifüj (Christ RVC 2-25)
 - Soğutucu (Christ LT-105 Cooling trap)
 - Vakum Pompası (Vacuubrand RZ 2.5)

3.2. BİTKİSEL MATERYAL

3.2.1. Bitkisel Materyalin Temini

Morus nigra meyveleri İzmir, Tire, Cambazlı Köyünde bulunan Tarımsal Kalkınma Kooperatifi denetimindeki populasyondan 2015 Haziran-Temmuz aylarında toplanmıştır.

Sabah erken saatlerde toplanan meyveler karadut kooperatifi tesislerinde bulunan -3 °C soğuk oda ve -38 °C lazer şoklama üniteleri kullanılarak taşımaya uygun hale getirilmişlerdir. Laboratuvara taşıma sürecinde soğuk taşıma kutuları kullanılmıştır. Sıcaklık ve ezilme etkisi ile meyve formunun bozulması ve meyve içerisinde mevcut olan suyun kaybı bu şekilde önlenmiştir. Laboratuvara getirilen meyve örnekleri 24 saat boyunca -80 °C’de saklanmış, ardından 8 gün boyunca -60 °C’de liyofilize edilmiş ve homojen bir küme haline getirilmiştir. Çalışma süresince liyofilize drog kümesi -30 °C’de saklanmıştır.

Herbaryum örneği Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, IZEF Herbaryumuna IZEF-5546 kod numarasıyla kaydedilmiştir.



Resim 2. *Morus nigra* L. genel görünüş

Zirai kültür formları olan *Raphanus sativus* ‘Red Meat’ kök ve *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* topraküstü kısımları İzmir, Bayındır, Tokatbaşı Köyünden 2015 Aralık ayında temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler parçalara ayrılmış ve kurutma kabinlerinde kurutulmuşlardır. Çalışma süresince kurutulmuş drog kümeleri -30 °C’de saklanmıştır.

3.2.2. *Morus nigra* L. Morfolojik Özellikleri ve Anatomik Yapıların İncelenmesi

Meyvelerin toplandığı *Morus nigra* popülasyonunda bulunan ağaçlardan yaprak örnekleri de alınarak laboratuvara getirilmiş ve Türkiye Florası'nda yer alan morfolojik özellikler uyarınca yaprak ve meyve örnekleri üzerinde incelemeler yürütülmüştür.

Yaprak örneklerinde yaprak boyu, eni, tipi, aya şekli, taban şekli, ucu, kenarı, üst yüzü, alt yüzü, lateral damarlanması, sap uzunluğu ve sap tüy tipi ile meyve örneklerinde meyve boyu, çapı, rengi ve sap uzunluğu özellikleri belirlenerek Türkiye Florası'nda *Morus nigra* deskripsiyonunda yer alan özellikler ile karşılaştırılmıştır.

Yaprakta bulunan anatomik yapıların tespitine yönelik olarak jilet yardımı ile yaprak enine ve boyuna kesitleri alınarak mikroskop altında incelenmiştir. Yaprığın anatomik ve morfolojik özelliklerini gösteren fotoğraflar Dinolite dijital mikroskopta x80, Olympus SZ61 stereo mikroskopta x25 ve Olympus CX21 binoküler mikroskopta x100 ve x400 büyütme oranları ile çekilmiştir.

3.3. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

3.3.1. Ekstraksiyon Çalışmaları

3.3.1.1 Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

Meyvelerin ekstraksiyonunda konvansiyonel ekstraksiyon sistemleri olarak organik çözücü kullanımı tabanlı yöntemler olan orbital çalkalayıcı ve ultrasonik banyo kullanılmıştır. Ekstraksiyon çalışmalarında liyofilize drog kullanılmıştır. Liyofilize karadut meyveleri öğütülerek homojenize edilmiştir. Balon joje içerisinde 5 g drog üzerine 50 mL EtOH:su:TFA (70:29:1) çözücü karışımı eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi karanlıkta, oda sıcaklığında, 1 saat boyunca orbital çalkalayıcı ya da ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrası ekstraler vakum yardımı ile nuçe erleni kullanılarak süzölmüştür. Süzölme sonrası kalan kısım ile meyve içeriği tüketilene kadar aynı yöntem kullanılarak ardışık beş ekstraksiyon daha yapılmıştır. İşlemlerin bitiminde tüm süzöntüler birleştirilmiş ve evaporatörde 40 °C'de ekstraksiyon çözücüsü uçurulmuştur. Ekstrelerin tam kuruluğa ulaşması vakum konsantratör sistemi kullanılarak sağlanmıştır. Her iki

yöntem için üç paralel ekstraksiyon çalışılmıştır. Laboratuvar çalışmaları süresince kuru ekstreler -30 °C’de saklanmıştır (63, 64).

3.3.1.2. İleri Ekstraksiyon Teknolojileri

3.3.1.2.1. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu

Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu çalışmaları 100 mL ekstraktör ve 500 mL toplayıcı hacmine sahip bir ekstraksiyon cihazı ile yürütülmüştür. Ekstraksiyon sistemi optimizasyonu çalışmaları için bağımsız değişken parametreler olarak sıcaklık, basınç ve co-solvan(etanol) ilavesi belirlenmiştir. Sıcaklık 40, 60 ve 80 °C; basınç 120, 160 ve 200 bar ve co-solvan ilavesi %2, 5 ve 8 değerleri ile çalışılmıştır. Tüm ekstraksiyonlar 7,5 g liyofilize drog, 60 dk. dinamik ekstraksiyon süresi ve 10 g/dk. akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Box-Benhenk deneysel tasarımı kullanılarak ekstraksiyon parametrelerine ait maksimum ve minimum değerler ile tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca oluşturulan deney deseni sunulmuştur (Tablo 1). Laboratuvar çalışmaları, deney deseninde belirtilen ekstraksiyon serileri uyarınca yürütülmüş ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde yanıt yüzey metodolojisinden faydalanılmıştır.



Resim 3. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon sistemi

Tablo 1. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu deney deseni

Run	Block	Factor 1 A:Temperature C	Factor 2 B:Pressure bar	Factor 3 C:Co-solvent %
1	Block 1	40.00	120.00	5.00
2	Block 1	40.00	160.00	2.00
3	Block 1	60.00	200.00	8.00
4	Block 1	80.00	120.00	2.00
5	Block 1	40.00	160.00	8.00
6	Block 1	60.00	160.00	5.00
7	Block 1	40.00	200.00	5.00

Süperkritik CO₂ ekstraktör haznesine liyofilize drog süzgeç yapısındaki ekstraktör kapsülü içerisinde yerleştirilmiştir. Toplayıcı haznesine ise ekstraksiyon işlemi sonrasında ekstreyi içerisinde biriktirecek olan kollektör kapsül yerleştirilmiştir. Ekstraktör ve kollektör başlıkları sıkılarak sisteme karbondioksit hattı bağlanmıştır. Karbondioksit tüpü açılarak sistem içerisine gaz akışı sağlanmış ve sistemin bilgisayar arayüzünde sistem içi karbondioksit akışının sabitlendiği dakikada 1 mL akış hızına gelinceye kadar beklenmiştir. Sistemin dengeye gelmesine kadar geçen süre statik ekstraksiyon süresi olarak kaydedilmiştir. Ekstraksiyon sistemi deneysel tasarımda uygulanacak parametre dizisine bilgisayar kontrolünde ulaşılmış ve ekstraksiyon işlemleri belirlen süreler uyarınca gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda sistem durdurularak kademeli olarak karbondioksit çıkış valfi açılmıştır. Bu esnada sıvı ve gaz faz arasında bulunan sistem içindeki süperkritik fazdaki akışkan, atmosfer basıncı altında gaz faza geri döndürülerek uçması sağlanmıştır. Sisteme eklenen etanol ise yoğunlaşarak sıvı faz dönmüş ve ekstre toplayıcı kısımda kapsül içerisinde biriktirilmiştir. Etanol içerisinde toplanan ekstre örnekleri cam balona alınmış ve 40 °C’de evaporator ile çözücü uçurulmuştur. Ekstrelerin tam kuruluğa ulaşması vakum konsantratör sistemi ile sağlanmıştır. Laboratuvar çalışmaları süresince kuru ekstreler -30 °C’de saklanmıştır.

3.3.1.2.2. Subkritik Su Ekstraksiyonu

Subkritik su ekstraksiyonu çalışmaları 100 mL ekstraktör hacmi ile 350 bar, 500 °C’de çalışma kabiliyetine sahip bir ekstraksiyon cihazı ile yürütülmüştür. Ekstraksiyon sistemi optimizasyonu çalışmaları için bağımsız değişken parametreler olarak sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve akış hızı belirlenmiştir. Sıcaklık 40, 60 ve 80

°C; ekstraksiyon süresi 20, 40 ve 60 dk. ve akış hızı 2, 4 ve 6 mL/dk. değerleri ile çalışılmıştır. Ekstraksiyon süresi ve akış hızı parametreleri açısından optimum değerlerin tespit edilmesi sonrası 100 °C ve 120 °C'de çalışılarak subkritik alan ekstraksiyonları yürütülmüştür. Tüm ekstraksiyonlar 10 g liyofilize drog kullanılarak 150 bar basınç değerinde gerçekleştirilmiştir. Box-Benken deneysel tasarımı kullanılarak ekstraksiyon parametrelerine ait maksimum ve minimum değerler ile toplam fenol, flavonoid, antosiyanin miktarı, LC-MS/MS antosiyanin miktarı ve tirozinaz inhibitör aktivite cevapları uyarınca oluşturulan deney deseni aşağıda sunulmuştur (Tablo 2). Laboratuvar çalışmalarına deney deseninde belirtilen ekstraksiyon serileri uyarınca yürütülmüş ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde yanıt yüzey metodolojisinden faydalanılmıştır.



Resim 4. Subkritik su ekstraksiyon sistemi

Tablo 2. Subkritik su ekstraksiyonu deney deseni

Run	Block	Factor 1 A:temperature C	Factor 2 B:time min	Factor 3 C:flow rate ml/min
1	Block 1	60.00	60.00	2.00
2	Block 1	80.00	60.00	4.00
3	Block 1	40.00	60.00	4.00
4	Block 1	60.00	20.00	6.00
5	Block 1	60.00	40.00	4.00
6	Block 1	80.00	40.00	2.00
7	Block 1	80.00	20.00	4.00
8	Block 1	60.00	40.00	4.00
9	Block 1	60.00	40.00	4.00
10	Block 1	80.00	40.00	6.00
11	Block 1	40.00	40.00	2.00
12	Block 1	40.00	40.00	6.00
13	Block 1	60.00	20.00	2.00
14	Block 1	40.00	20.00	4.00
15	Block 1	60.00	60.00	6.00

Subkritik su ekstraktör haznesi içerisine liyofilize drog tartılarak yerleştirilmiş ve 50 mL distile su ilave edilmiştir. Başlangıçta ekstraktöre su ilavesinin amacı sistem iç sıcaklığı belirlenen değerlere ulaşırken bitki materyalinin hızlı sıcaklık yükselişine bağlı zarar görmesini engellemektir. Ekstraktör haznesi kilitlenerek ısıtıcı modül çalıştırılarak sistemin belirlenen sıcaklığa ulaşması beklenmiştir. Belirlenen sıcaklığa ulaşıldığında subkritik su sistemi başlatılmıştır. Sistem içi basınç takip edilerek sistem çıkış vanası aracılığı ile tüm deney setlerinde 150 bar sabit basınç değerinde çalışılmıştır. Devamlı akış ile belirlenen sıcaklık ve basınç değerlerinde ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ekstreler cam balona toplanmış ve 40 °C’de evaporator ile çözücü uçurulmuştur. Ekstrelerin tam kuruluğa ulaşması vakum konsantratör sistemi ile sağlanmıştır. Laboratuvar çalışmaları süresince kuru ekstreler -30 °C’de saklanmıştır.

3.3.1.2.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon çalışmaları 150 bar, 250 °C’de çalışma kabiliyetine sahip kapalı kap sistemli bir ekstraksiyon cihazı ile yürütülmüştür. Ekstraksiyon sistemi optimizasyonu çalışmaları için bağımsız değişken parametreler olarak mikrodalga gücü, ekstraksiyon çözücüsünde etanol oranı ve ekstraksiyon süresi belirlenmiştir. Mikrodalga gücü 300, 500 ve 700 watt; etanol oranı %0, %35 ve %70; ekstraksiyon süresi 5, 10 ve 15 dk. değerleri ile çalışılmıştır. Tüm ekstraksiyonlar 35°C sabit sıcaklıkta, 1:50 drog:çözücü oranında ve çözücü karışımına %1 TFA ilaveli olarak çalışılmıştır. Box-Benhken deneysel tasarımı kullanılarak ekstraksiyon parametrelerine ait maksimum ve minimum değerler ile toplam fenol, flavonoit, antosiyanin miktarı, LC-MS/MS antosiyanin miktarı ve tirozinaz inhibitör aktivite cevapları uyarınca oluşturulan deney deseni aşağıda sunulmuştur (Tablo 3). Laboratuvar çalışmalarına deney deseninde belirtilen ekstraksiyon serileri uyarınca yürütülmüş ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde yanıt yüzey metodolojisinden faydalanılmıştır.



Resim 5. Mikrodalga ekstraksiyon sistemi

Tablo 3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon deney deseni

Run	Block	Factor 1 A:power watt	Factor 2 B:ethanol conc %	Factor 3 C:time min
1	Block 1	500.00	35.00	10.00
2	Block 1	500.00	70.00	5.00
3	Block 1	700.00	35.00	15.00
4	Block 1	500.00	35.00	10.00
5	Block 1	300.00	70.00	10.00
6	Block 1	500.00	0.00	5.00
7	Block 1	700.00	35.00	5.00
8	Block 1	300.00	35.00	15.00
9	Block 1	500.00	35.00	10.00
10	Block 1	500.00	70.00	15.00
11	Block 1	300.00	35.00	5.00
12	Block 1	700.00	70.00	10.00
13	Block 1	500.00	0.00	15.00
14	Block 1	700.00	0.00	10.00
15	Block 1	300.00	0.00	10.00

Mikrodalga ekstraktör içerisinde yer alan altı tüp haznenin her birine 0,5 g liyofilize drog tartılarak yerleştirilmiştir. Belirlenen deney setinde yer alan çözücü sistemi hazırlanarak her hazneye 25 mL eklenmiştir. Tüp hazneler sistem içerisine kilitlenerek yerleştirilmiştir. Mikrodalga ekstraktör sistem arayüzüne belirlenen değerler girilerek sistem çalıştırılmıştır.

Ekstraksiyon süresi sonunda tüp haznelerden alınan ekstratler balon jöjeye toplanmış ve vakum altında nuçe erleni ile süzölmüştür. 40 °C’de evaporator ile çözücü uçurulmuş ve ekstratlerin tam kuruluğa ulaşması vakum konsantratör sistemi ile sağlanmıştır. Laboratuvar çalışmaları süresince kuru ekstratler -30 °C’de saklanmıştır.

3.3.2. Analiz çalışmaları

Ekstrelerde yer alan hedef biyoaktif bileşen gruplarının tayininde spektrofotometre ve UPLC-DAD-ESI-MS/MS sistemleri kullanılmıştır. Spektrofotometrik olarak toplam fenol, toplam flavonoit ve toplam antosiyanin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS ile siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit miktarları siyanidin-3-glikozit eşdeğeri olarak belirlenerek toplam antosiyanin miktarı tespit edilmiştir.

3.3.2.1. Spektrofotometrik Analizler

3.3.2.1.1. Toplam Fenol Tayini

Toplam fenol tayininde Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır. 0,1 mL ekstre örneği (suda çözülmüş) deney tüpüne alınmıştır. Üzerine 1,25 mL Folin reaktifi (distile su ile on kata seyreltilmiş) eklenip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4 dk. Beklemeye bırakılmıştır. Ardından 1 mL doygun sodyum karbonat çözeltisi eklenmiş, karıştırıldıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında karanlıkta beklemeye bırakılmıştır. Her örnek üç tekrarlı çalışılmış ve 760 nm'de köre (distile su) karşı spektrofotometrede okumalar yapılmıştır. 0-250 µg/mL konsantrasyon aralığında 7 nokta ile çizilmiş olan gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak örnek içerisindeki toplam fenol miktarı mg/g gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır (20).

3.3.2.1.2. Toplam Flavonoit Tayini

Toplam flavonoit tayininde alüminyum klorür metodu kullanılmıştır. Deney tüpünde 0,25 mL ekstre örneği (suda çözülmüş) üzerine 0,75 mL etanol, 0,05 mL %10'luk alüminyum klorür çözeltisi, 0,05 mL 1M potasyum asetat çözeltisi ve 1,4 mL distile su eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım karanlıkta oda sıcaklığında 40 dk. bekletilmiştir. Her örnek üç tekrarlı çalışılmış ve 415 nm'de köre (distile su) karşı spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri 0-100 µg/mL konsantrasyon aralığında 7 nokta kullanılarak çizilmiş olan kersetin kalibrasyon eğrisinde kullanılarak örnek içerisindeki toplam flavonoit miktarı mg/g kersetin eşdeğeri olarak hesaplanmıştır (39).

3.3.2.1.3. Toplam Antosiyanin Tayini

Örneklerin toplam antosiyanin miktar tayinleri pH değişim yöntemi ile yapılmıştır. pH değişim yönteminde antosiyaninlerin farklı pH değerlerinde halka

yapılarında meydana gelen değişime bağlı olarak absorbans değerlerindeki farklılaşmadan yararlanır. 1 L 0,025 M potasyum klorüre 6,3 mL hidroklorik asit eklenerek pH 1,0 tampon ve 1 L 0,4 M sodyum asetata 20 mL hidroklorik asit eklenerek pH 4,5 tampon elde edilmiştir. Suda çözülen ekstre örnekleri pH 1,0 ve pH 4,5 tamponlar ile seyreltilerek 20 dk. karanlıkta oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 520 nm ve 700 nm’de köre karşı (distile su) okunmuştur. Ekstre örneklerinin seyreltilmesinde, okunan absorbans değerlerinin 0,2-1 AU olarak spektrofotometre lineer aralığında kalacak şekilde olması ölçüt alınmış ve tamponlar ile kaç kata seyreltildiği formülde kullanılmıştır. Okunan absorbans değerleri aşağıdaki formülde kullanılarak toplam antosiyanin miktarına mg/L siyanidin-3-glikozit eşdeğeri olarak ulaşılmıştır (65). Çalışılan ekstre örneğinin µg/mL cinsinden konsantrasyonu üzerinden mg/g siyanidin-3-glikozit eşdeğeri olarak toplam antosiyanin miktarı hesaplanmıştır.

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

$$A = (\text{Absorbans}_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH 1.0}} - (\text{A}_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH 4.5}}$$

$$MW \text{ (molekül ağırlığı)} = 449.2 \text{ g/mol (siyanidin-3-glikozit için)}$$

$$DF = \text{seyreltme faktörü}$$

$$l = \text{ışın yolu (cm)}$$

$$\epsilon = 26.900 \text{ molar absorplama katsayısı (L x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{) (siyanidin-3-glikozit için)}$$

$$10^3 = \text{g değeri mg a çevirme katsayısı}$$

3.3.2.2. LC-MS/MS Analizleri

Ekstre örnekleri içerisinde yer alan antosiyanin molekülleri siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit’in kalitatif ve kantitatif analizleri UPLC-DAD-ESI-MS/MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Literatürde yer alan bir yöntemden faydalanarak uygun analiz metodu geliştirilmiştir (49). 50 x 2.1 mm, 1.7 µm Synchronis marka kolon ve 10 x 2.1 mm, 3 µm özelliklerinde ön kolon ile çalışılmıştır. Akış hızı 200 µl/dk, enjeksiyon miktarı 10 µl, kolon fırını sıcaklığı 30 °C’dir. Tüm örnekler analiz öncesinde 0,2 µm PTFE filtreden süzölmüştür. Mobil faz gradient akışı şeması şu şekildedir; 0. dk 90A:10B; 1. dk 90A:10B; 7. dk 70A:10B; 9. dk. 90A:10B ve 10. dk. 90A:10B. Mobil faz A su:formik asit (90:10) ve mobil faz B su:formikasit:asetonitril (40:10:50) içermektedir. DAD dedektör ile 515 nm’de ve MS dedektör ile SRM

(selected reaction monitoring) modda analizler yapılmıştır. Elektrosprey iyonizasyonu pozitif modda çalışılmıştır (5). Kütle spektrometresi için iyonizasyon koşulları optimize edilerek kapiler sıcaklık 317 °C, vaporizör sıcaklığı 250 °C, sprej voltajı 3000 V, taşıyıcı gaz akış hızı 20 (arbitrary units) ve yardımcı gaz akış hızı 5 (arbitrary units) olarak belirlenmiştir. Antosiyaninler için referans standard olarak siyanidin-3-glikozit ile 1-50 µg/mL konsantrasyon aralığında 7 nokta ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Üç tekrarlı analizler sonucunda ekstrelerde bulunan siyanidin-3-glikozit miktarı ile siyanidin-3-glikozit eşdeğeri olarak siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit miktarları belirlenmiştir. Literatürde sıkça başvurulan bir yöntem olarak LC-MS/MS ile toplam antosiyanin miktar tayini bu dört ana antosiyanin pikinin toplamı ile gerçekleştirilmiş, sonuçlar siyanidin-3-glikozit eşdeğeri olarak belirlenmiştir (63, 66, 67).

3.3.2.3. Aktiviteden Sorumlu Fraksiyonun Tespiti

Ekstraksiyon sistemlerinde optimizasyon sonrası tespit edilen en yüksek tirozinaz inhibitör aktiviteye sahip ekstrelerde etkidenden sorumlu bileşenlerin tespiti için fraksiyonlama çalışmaları yapılmıştır. Optimum süperkritik karbondioksit ekstresinin fraksiyonlama çalışmaları açık kolon kromatografisi ile dolgu materyali olarak silika jel ve mobil faz olarak değişen oranlarda hekzan, etilasetat ve metanol (hekzan:etilasetat ve etilasetat:metanol karışımları 100:0'dan %10'luk değişimler ile 0:100'e kadar) kullanılarak yürütülmüştür. Silika jel kolon ayrımı sonrası fraksiyonların belirlenmesinde ince tabaka kromatografisi ile elde edilen profiller kullanılmıştır. Alüminyum plaklar (Merck, silika jel 60 F₂₅₄, 1.05554) üzerine fraksiyonlar tatbik edilerek 90:10 ve 80:20 hekzan:etilasetat tank sistemleri ile ayrımlar sağlanmıştır. İTK plakları vanilin-sülfirik asit tatbik edilerek 254-366 nm UV lambda ile incelenmiştir. Optimum subkritik su ve mikrodalga destekli ekstrelerin fraksiyonlama çalışmalarında dolgu materyali olarak ters faz silika (RP C18), mobil faz olarak ise değişen oranlarda su:metanol karışımları (100:0'dan %10'luk değişimler ile 0:100'e kadar) kullanılmıştır. RP silika metanol içerisinde süspand edilerek kartuşa yüklenmiş ve metanol akışı ile kolonun oturması sağlanmıştır. Kolon elüsyon başlangıç mobil fazı olan %100 su ile şartlanmış ve mobil faz polaritesi azalacak şekilde elüsyon sağlanmıştır. Sinterli kartuş ve vakum manifoldu kullanarak ekstreler fraksiyonlara ayrılmıştır. Ters faz silika kolon ayrımı sonrası fraksiyonların belirlenmesinde ince tabaka kromatografisi ile elde edilen profiller kullanılmıştır.

Aluminyum plaklar (Merck, silika jel 60 F₂₅₄, 1.05554) üzerine fraksiyonlar tatbik edilerek 64:50:10 kloroform:metanol:su ve 100:11:11:27 etil asetat:formik asit:glasiyel asetik asit:su sistemleri ile ayrımlar sağlanmıştır. İTK plakları 254-366 nm UV lamba ile incelenmiştir. UV aktif olmayan moleküllerin gözlenmesi için ise 64:50:10 mobil faz sistemi plaklarına vanilin-sülfirik asit tatbik edilerek ısıtılmış ve 100:11:11:27 sistemi plaklarına NP PEG reaktifi tatbik edilmiştir (68).

Fraksiyonlama işlemi sonrası elde edilen fraksiyonların tirozinaz inhibitör aktiviteleri çalışılmış ve kalitatif-kantitatif analizleri LC-MS/MS ile yapılmıştır. Ekstrelerin tirozinaz inhibitör aktivitesinden sorumlu başlıca bileşenler tespit edilmiştir.

3.3.3. Ekstraksiyon ve Analiz Validasyonu

Ekstraksiyon ve analiz çalışmalarında kullanılan yöntemlerin geçerliliğinin gösterilmesine yönelik olarak validasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Ekstraksiyon validasyonu amacıyla kör ekstraksiyon, ekstraksiyon tekrarlanabilirliği, ekstraksiyon geri kazanımı ve ekstraksiyon sonrası atılan kısımda miktar tayini çalışmaları yürütülmüştür. Kullanılan ekstraksiyon sistemleri ve gereçlerden ekstreye geçiş olup olmadığının kontrolü amacıyla araştırma materyali içermeyen sisteme siyanidin-3-glikozit standardı eklenerek ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır. Ekstraksiyon tekrarlanabilirliğinin sunulabilmesi amacıyla çalışılan ekstraksiyon sistemleri 3 paralel olarak yürütülmüştür. Ekstrelerde hedef biyoaktif bileşen grubu olan antosiyaninlerin ekstre edilebilme kapasitelerinin araştırılmasına yönelik olarak ekstraksiyon geri kazanımı çalışmalarında belirlenen miktarda siyanidin-3-glikozit standardı ekilmiş drog ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri sonrasında atılan kısımda kalan biyoaktif bileşenlerin tespiti amacıyla kalan drog tekrar ekstre edilerek atılan kısımda miktar tayini analizleri yürütülmüştür. Ekstraksiyon validasyonu çalışmaları sonucu elde edilen ekstrelerin analizleri spektrofotometre ve LC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir.

Analiz validasyonuna yönelik olarak linearite, tekrarlanabilirlik, gün içi stabilite ve günler arası stabilite çalışmaları yürütülmüştür. Antosiyanin miktar tayini çalışmalarında standart referans olarak kullanılan siyanidin-3-glikozit ile 7 farklı konsantrasyonda 3 tekrarlı olarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Analiz tekrarlanabilirliğinin gösterilmesi amacıyla aynı ekstre örneğinin ardışık 10 analizi gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerde analizler boyunca bozulmaya bağlı olarak hedef

içerikte değişim olup olmadığının kontrolü amacıyla aynı analiz gününün başında, ortasında ve sonunda aynı ekstre örneğinin analizi yapılmıştır. Ardışık üç analiz gününde de aynı ekstre örneğinin analizleri tekrarlanarak günler arası stabilite çalışması yürütülmüştür. Analiz validasyonu çalışmaları LC-MS/MS analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. TİROSİNAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Tirozinaz inhibitör aktivite çalışmalarına yönelik olarak literatürde yer alan aktivite protokolleri ile denemeler yapılmıştır. Farklı protokoller ile oldukça farklı sonuçların alınması sonrasında standard ajan olan kojik asit kullanılarak enzim inhibisyon kinetik çalışmaları ile aktivite protokolü optimize edilerek tirozinaz inhibitör aktivite metodu oluşturulmuştur. Tirozinaz inhibitör aktivite çalışmalarında ortam olarak 50 mM pH 6.8 fosfat tamponu, substrat olarak L-dopa ve referans ajan olarak kojik asit kullanılmıştır. Çift tekrarlı çalışılarak L-dopa'nın tirozinaz enzimi aracılığı ile dopakroma dönüşümü mikropalak okuyucu ile 475 nm'de köre (inhibitör olmaksızın enzim aktivitesi) karşı analiz edilmiş, bu reaksiyonun oluşumunun önlenilme kapasitesi hesaplanarak tirozinaz inhibitör aktivite olarak belirtilmiştir.

3.4.1. Aktivite Protokolü Optimizasyonu

Substrat olarak L-dopa ve inhibitör olarak kojik asit ile literatürde yer alan inhibisyon kinetik verilerine uyum esas alınmıştır. Reaksiyon sürecinde enzim hızının lineer olduğu ilk hızların tespit edilmesi tirozinaz inhibitör aktivite sonuçlarının doğru tespit edilmesi için kritik önem taşımaktadır. Bu amaç doğrultusunda uygun substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, reaksiyonu etkilemeyecek ekstre çözücüsü miktarı (DMSO sınırı) ve reaksiyon ölçüm yöntemi (endpoint ya da kinetik okuma) belirlenerek aktivite protokolü optimize edilmiştir. 96 kuyucuklu mikropalaka ile oluşturulan protokole göre 150 µl 2mM L-dopa (50 mM pH 6.8 fosfat tamponu içerisinde) üzerine 25 µl ekstre (DMSO ile çözülüp fosfat tamponu ile seyreltilmiş) eklenerek 25 °C'de 2 dk. karıştırılır. Bu karışıma 25 µl tirozinaz enzimi (50 Unit/mL, fosfat tamponu içerisinde) eklenerek reaksiyon

başlatılır. Absorbans değerleri 475 nm'de 10 dk. boyunca 30 sn. aralıklı kinetik okumalar ile kaydedilir. Zamana bağlı absorbans artışının (reaksiyon hızının) lineer olduğu aralıktaki absorbans farkı kullanılarak aşağıdaki formül ile tirozinaz inhibitör aktivite hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{k\ddot{o}r} - A_{\ddot{o}rnek})}{A_{k\ddot{o}r}}$$

$A_{k\ddot{o}r}$: inhibitör içermeyen örnek

$A_{\ddot{o}rnek}$: ekstre örneği

3.4.2. Enzim İnhibisyon Kinetikleri

Aktivite protokolünün optimizasyonu ve doğruluğunun gösterilmesi için literatür verileri ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla enzim inhibisyon kinetikleri çalışılmıştır. Tekil substrat olarak L-dopa ve tekil inhibitör olarak kojik asit kullanılmıştır. Oluşturulan aktivite protokolü kullanılarak L-dopa'nın 50-1500 µM aralığında 7 farklı konsantrasyonu ve kojik asidin 2-75 µM aralığında 5 farklı konsantrasyonu ile Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri oluşturulmuştur. Enzim inhibisyon kinetik sonuçlarının değerlendirilmesinde Sigma Plot 12.0 Enzyme Kinetics Module 1.3 programından faydalanılmıştır.

3.4.3. Ekstrelerin Tirozinaz İnhibitör Aktivitesinin Araştırılması

Tirozinaz inhibitör aktivite çalışmaları geliştirilen aktivite protokolü uyarınca yürütülmüştür. Ekstre örnekleri çözünebilme durumuna göre 50 mM pH 6.8 fosfat tamponu ya da DMSO içerisinde çözülmüştür. Reaksiyon ortamı içerisinde DMSO'nun reaksiyon hızına girişim yapmadığı sınır konsantrasyon belirlenmiştir. DMSO ile çözülen ekstreler fosfat tamponu ile uygun oranda seyreltilerek aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Ekstrelerin aktivitesi kör okumalar ile % inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Değişen konsantrasyonlarda ekstre aktiviteleri çalışılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

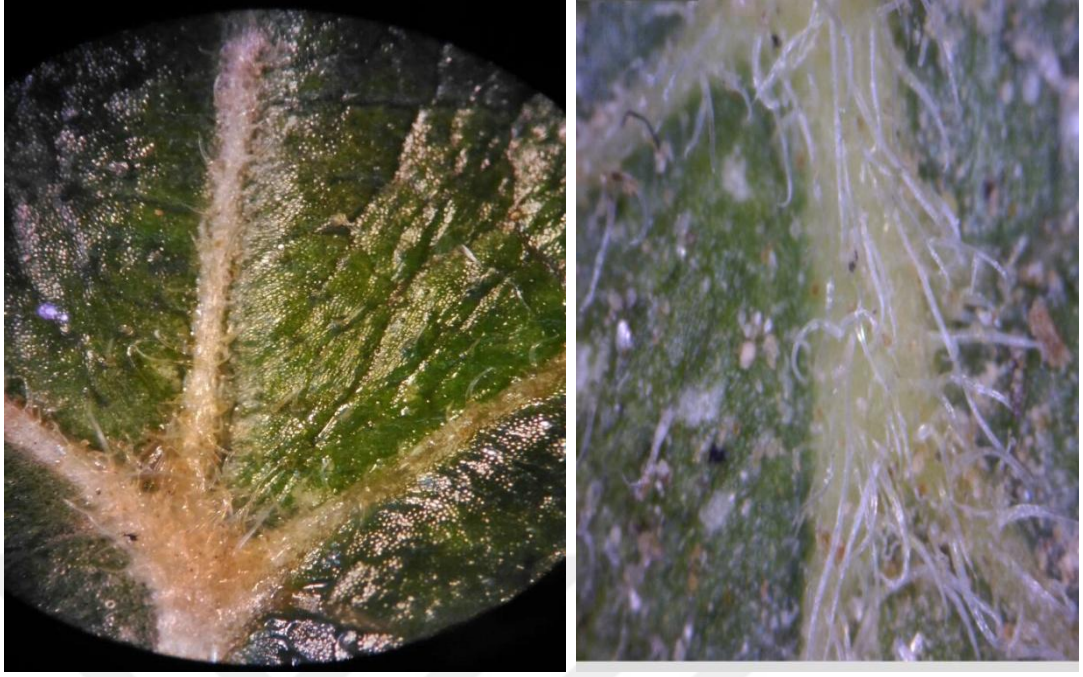
BÖLÜM 4. BULGULAR

4.1. BOTANİK BULGULAR

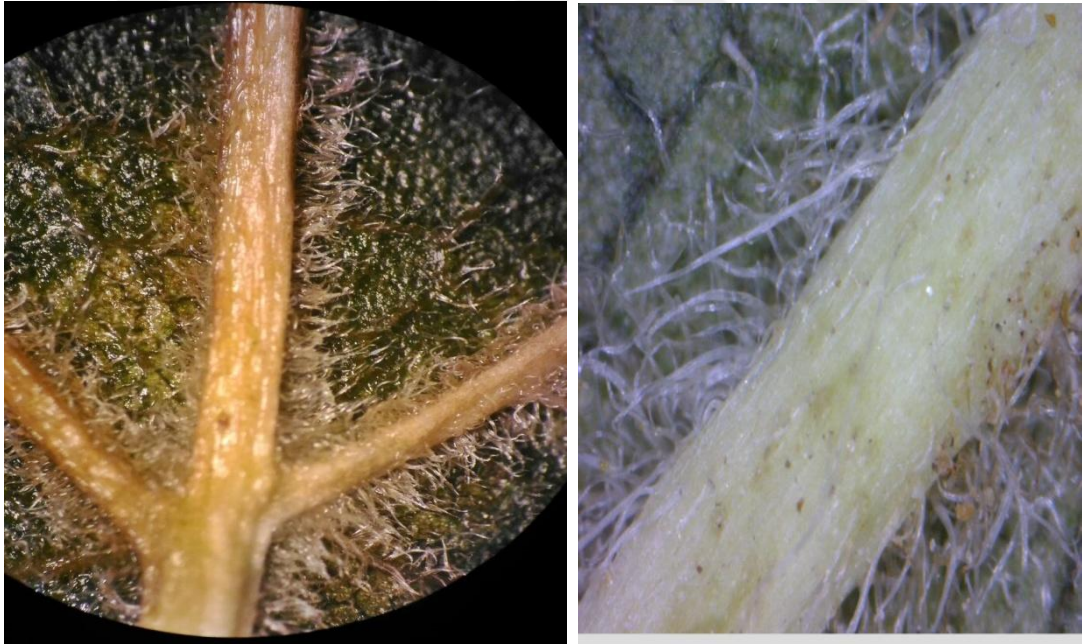
Meyvelerin toplandığı *Morus nigra* ağaçlarından alınan yaprak örnekleri üzerinde Türkiye Flora'sında *Morus nigra* deskripsiyonunda belirtilen morfolojik karakterler uyarınca incelemeler yapılmıştır. Yaprak örneklerinde saptanan morfolojik varyasyonlar Tablo 4 ve Resim 6, Resim 7, Resim 8, Resim 9, Resim 10, Resim 11, Resim 12, Resim 13'de ve meyve örnekleri Tablo 5 ve Resim 14 ile sunulmuştur. Yaprığın anatomik ve morfolojik özelliklerini gösteren fotoğraflar Dinolite dijital mikroskopta x80, Olympus SZ61 stereomikroskopta x25 ve Olympus CX21 binoküler mikroskopta x100 ve x400 büyütme oranları ile çekilmiştir.

Tablo 4. *Morus nigra* yapraklarında morfolojik varyasyonlar

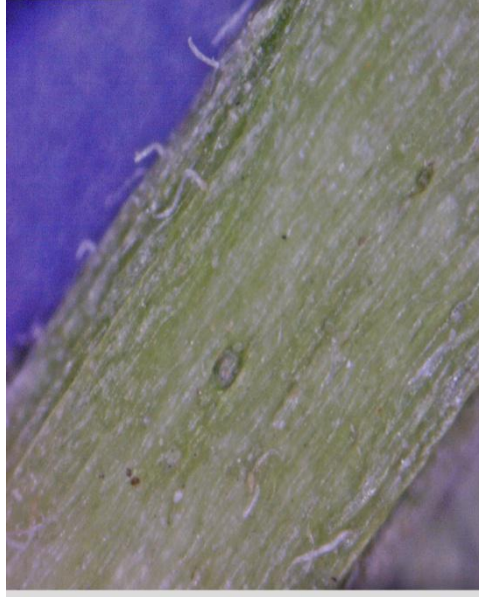
Yaprak morfolojik özellikleri	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Tespit edilen özellikler	Türkiye Flora'sında belirtilen özellikler
Yaprak boyu	16,4 cm	14,2 cm	16,2 cm	12,5 cm	9,5 cm	9,5-16,4 cm	6-20 cm
Yaprak eni	15,3 cm	12,0 cm	15,2 cm	14,0 cm	9,0 cm	9,0-15,3 cm	-
Yaprak tipi	basit	3-loblu	basit	basit	3-loblu	basit-3 loblu	basit-2-3 loblu
Yaprak ayası şekli	geniş ovat	geniş ovat	geniş ovat	geniş ovat	geniş ovat	geniş ovat	geniş ovat
Yaprak tabanı şekli	derin kalpsi	derin kalpsi	derin kalpsi	derin kalpsi	derin kalpsi	derin kalpsi	derin kalpsi
Yaprak ucu	akut	akut	akuminat	akut	akuminat	akut-akuminat	akut-akuminat
Yaprak kenarı	kaba dişli	kaba dişli	kaba dişli	kaba dişli	kaba dişli	kaba dişli	kaba dişli
Üst yüzü	koyu yeşil, scabrous	koyu yeşil, scabrous	koyu yeşil, scabrous	koyu yeşil, scabrous	koyu yeşil, scabrous	koyu yeşil, scabrous	koyu yeşil, scabrous
Alt yüzü	açık yeşil, pubescent	açık yeşil, pubescent	açık yeşil, pubescent	açık yeşil, pubescent	açık yeşil, pubescent	açık yeşil, pubescent	pubescent
Lateral damarlanma	8	7	8	7	6	6-8	-
Sap uzunluğu	2,7 cm	1,8 cm	2,4 cm	2,2 cm	2,0 cm	1,8-2,7 cm	1,5-2,5 cm
Yaprak sapı tüy tipi	basık kılsı	basık kılsı	basık kılsı	basık kılsı	basık kılsı	basık kılsı (adpressed setaceous)	-



Resim 6. Yaprak üst yüzeyi sert kılsı (scabrous) örtü tüyleri (x25 ve x80 büyütme)



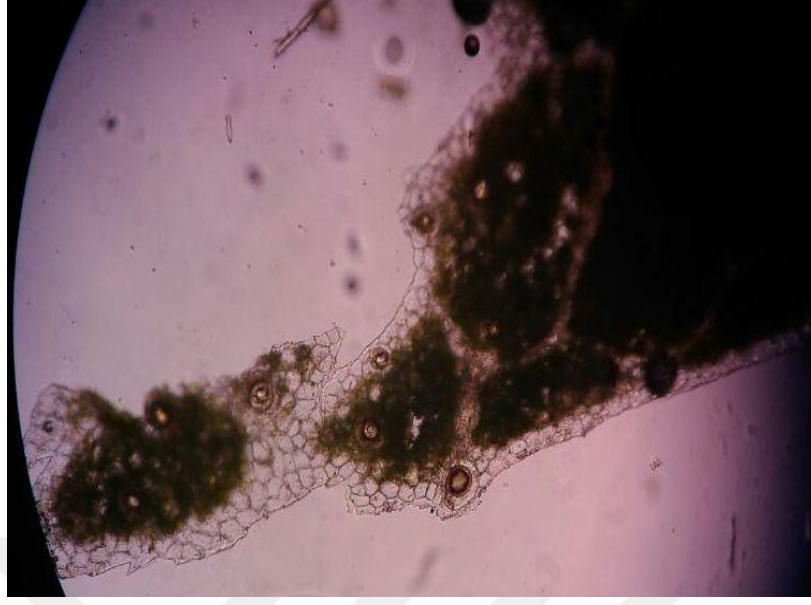
Resim 7. Yaprak alt yüzeyi yumuşak örtü tüyleri (pubescent) (x25 ve x80 büyütme)



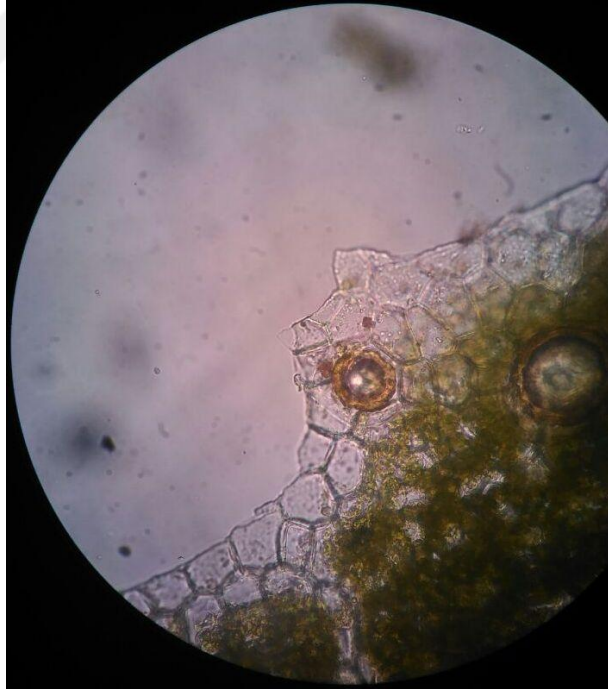
Resim 8. Yaprak sapı basık kılsı örtü tüyleri (adpressed setaceous) (x80 büyütme)



Resim 9. Yaprak enine kesiti, düz ve kancalı tip örtü tüyleri (x100 büyütme)



Resim 10. Yaprak üst yüzeyi kalkansı salgı tüyleri (peltate gland) yüzeysel kesit
(x100 büyütme)



Resim 11. Yaprak üst yüzeyi kalkansı salgı tüyleri (peltate gland) yüzeysel kesit
(x400 büyütme)



Resim 12. Yaprak şekli varyasyonları; basit ve 3-loblu yapraklar



Resim 13. Yaprak özellikleri; lamina ucu, tabanı ve kenarı

Tablo 5. *Morus nigra* meyvelerinde morfolojik varyasyonlar

Meyve morfolojik özellikleri	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Tespit edilen özellikler	Türkiye Flora'sında belirtilen özellikler
Meyve rengi	Siyahımsı mor	Siyah	Siyahımsı mor	Siyah	Siyah	Siyahımsı mor- siyah	Siyahımsı mor- siyah
Meyve boyu	2,7 cm	2,4 cm	3,2 cm	2,5 cm	2,6 cm	2,4-3,2 cm	2-2,5 cm
Meyve çapı	1,8 cm	1,6 cm	1,9 cm	1,8 cm	2 cm	1,6-2 cm	-
Meyve sapı uzunluğu	0,3 cm	0,2 cm	0,2 cm	0,2 cm	0,3 cm	0,2-0,3 cm	-



Resim 14. *Morus nigra* meyveleri

4.2. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR AİT BULGULAR

4.2.1. Bitkisel Materyal

Morus nigra meyvelerinin toplanma ve laboratuvara taşınma işlemi sonrasında kurutma çalışmalarına başlanmıştır. Meyveler liyofilizatör ile -60 °C'de 8 gün sonunda tamamen kurutulmuşlardır. Farklı seriler halinde yürütülen liyofilizasyon çalışmasına ait sonuçlar Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9 ile sunulmuştur.



Resim 15. *Morus nigra* liyofilize meyveler

Tablo 6. Liyofilizasyon seri 1 sonuçları

Liyofilizasyon seri 1	Taze drog mg	Liyofilize drog mg	Kurutma yüzdesi %
Örnek 1	92291	16901	18,31
Örnek 2	96890	18331	18,92
Örnek 3	91009	17600	19,34
Örnek 4	115401	21611	18,73
Örnek 5	100786	19316	19,17
Örnek 6	93215	17950	19,26
Ortalama			18,95
Standart sapma			0,39
%RSD			2,04

Tablo 7. Liyofilizasyon seri 2 sonuçları

Liyofilizasyon seri 2	Taze drog mg	Liyofilize drog mg	Kurutma yüzdesi %
Örnek 1	121.629	24.784	20,38
Örnek 2	117.264	23.576	20,11
Örnek 3	120.760	25.316	20,96
Örnek 4	117.182	25.182	21,49
Örnek 5	119.876	24.624	20,54
Örnek 6	120.528	25.431	21,10
Ortalama			20,76
Standart sapma			0,51
%RSD			2,47

Tablo 8. Liyofilizasyon seri 3 sonuçları

Liyofilizasyon seri 3	Taze drog mg	Liyofilize drog mg	Kurutma yüzdesi %
Örnek 1	120.013	23.785	19,82
Örnek 2	120.222	24.499	20,38
Örnek 3	120.755	23.769	19,68
Örnek 4	120.473	25.344	21,04
Örnek 5	124.126	27.251	21,95
Örnek 6	120.598	25.373	21,04
Ortalama			20,65
Standart sapma			0,86
%RSD			4,17

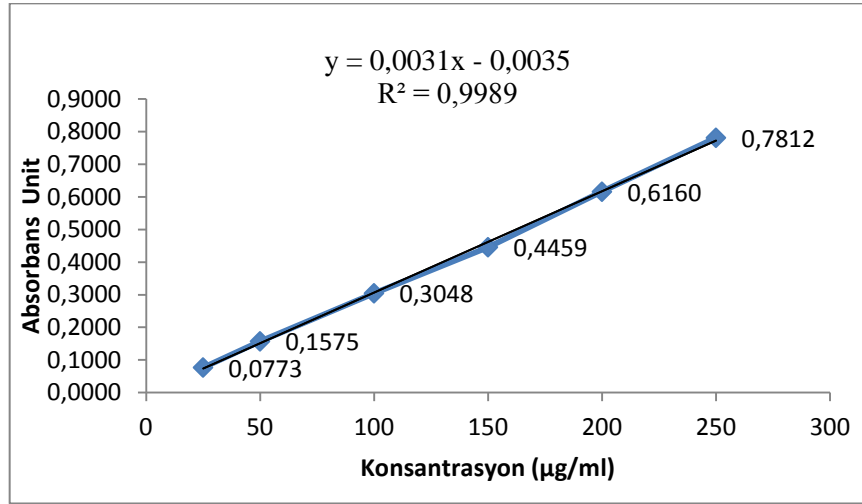
Tablo 9. Liyofilizasyon serileri sonuçları

Liyofilizasyon serileri	Taze drog mg	Liyofilize drog mg	Kurutma yüzdesi %
Seri 1	98265	18618	18,95
Seri 2	119540	24819	20,76
Seri 3	121031	25004	20,65
Ortalama			20,12
Standart sapma			1,01
%RSD			5,04

4.2.2. Analiz Çalışmalarına Ait Bulgular

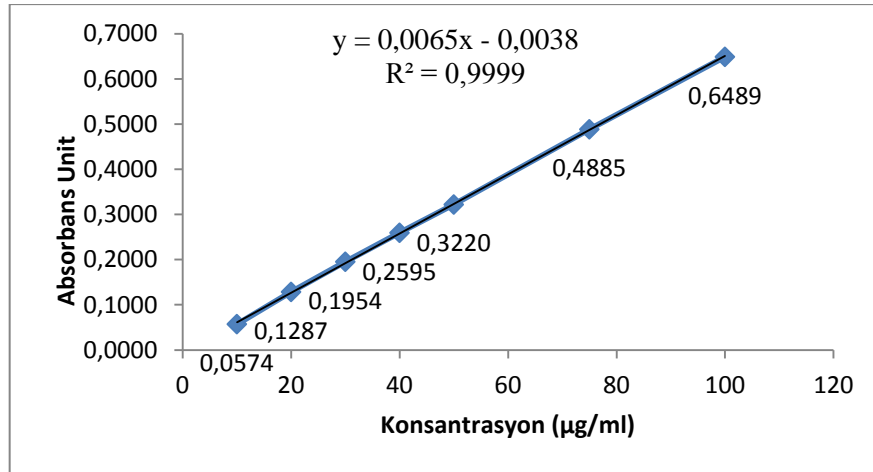
4.2.2.1. Spektrofotometrik Analizler

Toplam fenol miktar tayini çalışmaları spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak sunulmuştur. Gallik asit standardının 25-250 µg/mL konsantrasyon aralığında altı noktalı üç tekrarlı olarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 6). Tayin yöntemi uyarınca elde edilen absorbans değerlerinin gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanması ile ekstraların toplam fenol miktarları mg/g gallik asit eşdeğeri olarak sunulmuştur.



Şekil 6. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

Toplam flavonoid miktar tayini çalışmaları spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kersetin eşdeğeri olarak sunulmuştur. Kersetin standardının 10-100 µg/mL konsantrasyon aralığında yedi noktali üç tekrarlı olarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 7). Tayin yöntemi uyarınca elde edilen absorbans değerlerinin kersetin kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanması ile ekstraların toplam flavonoid miktarları mg/g kersetin eşdeğeri olarak sunulmuştur.

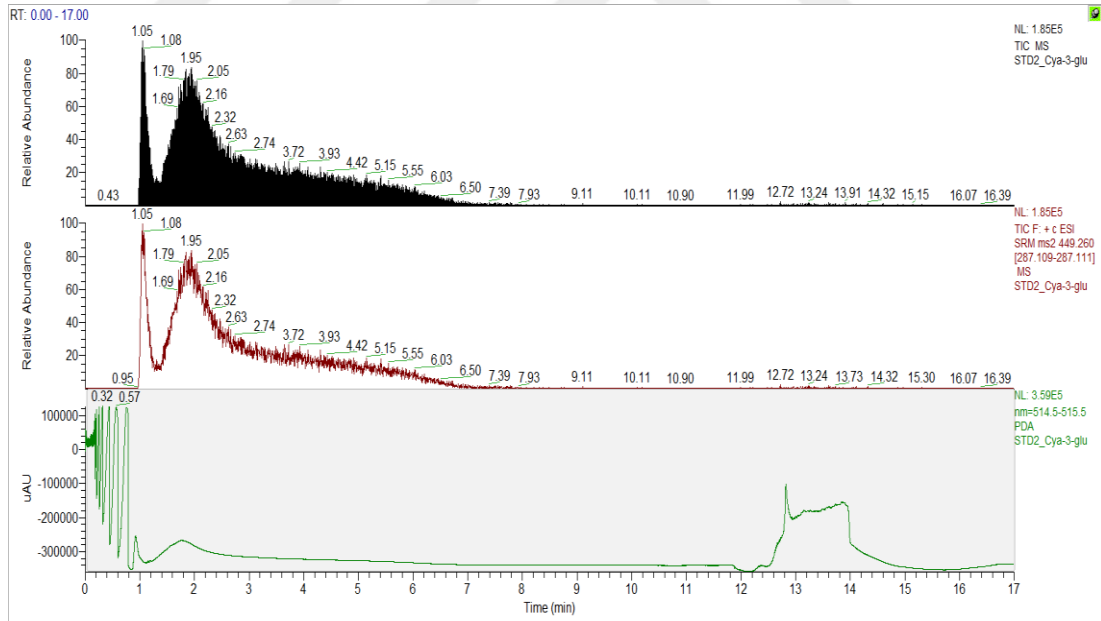


Şekil 7. Kersetin kalibrasyon eğrisi

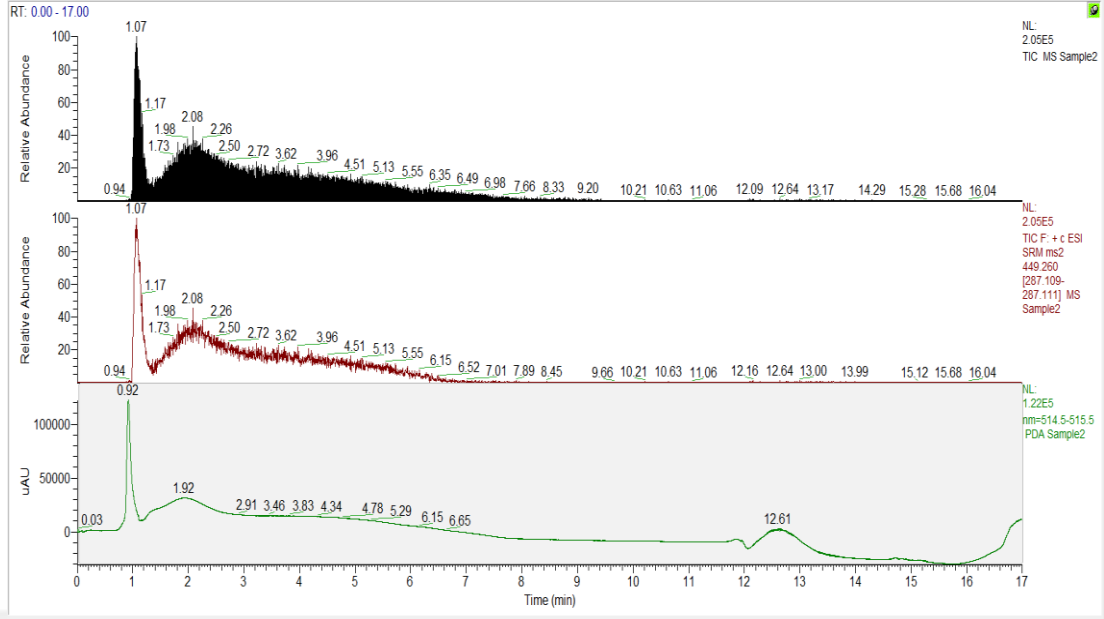
4.2.2.2. LC-MS/MS Analizleri

LC-MS/MS ile antosiyanin miktar tayinine yönelik olarak metot geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Literatürde yer alan metotlar ile yapılan çalışmalarda hedef moleküller olan siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit analizleri başarılı olmamıştır. Taban çizgisi doğruluğu ve piklerin kuyruk yapmaksızın keskin ayrımının sağlanabilmesi amacıyla mobil faz gradient elüsyonu ile zaman aralıkları belirlenerek 10 dk. toplam okuma süresi boyunca dört antosiyanin molekülünün de analizini sağlayan bir yöntem geliştirilmiştir. Metot geliştirme aşamasında 50 x 2.1mm, 1.7 µm ve 100 x 2.1mm, 3 µm UPLC kolonları kullanılarak gradient akış şeması, akış hızı, kolon fırın sıcaklığı ve toplam analiz süresi parametreleri üzerinde çalışmalar yürütülmüştür.

17 dk.'lık toplam analiz süresine sahip metot 1 (69) ile yapılan siyanidin-3-glikozit standardı ve *Morus nigra* meyve ekstresi LC-MS/MS analizi sonuçları Kromatogram 1 ve Kromatogram 2 ile gösterilmiştir.

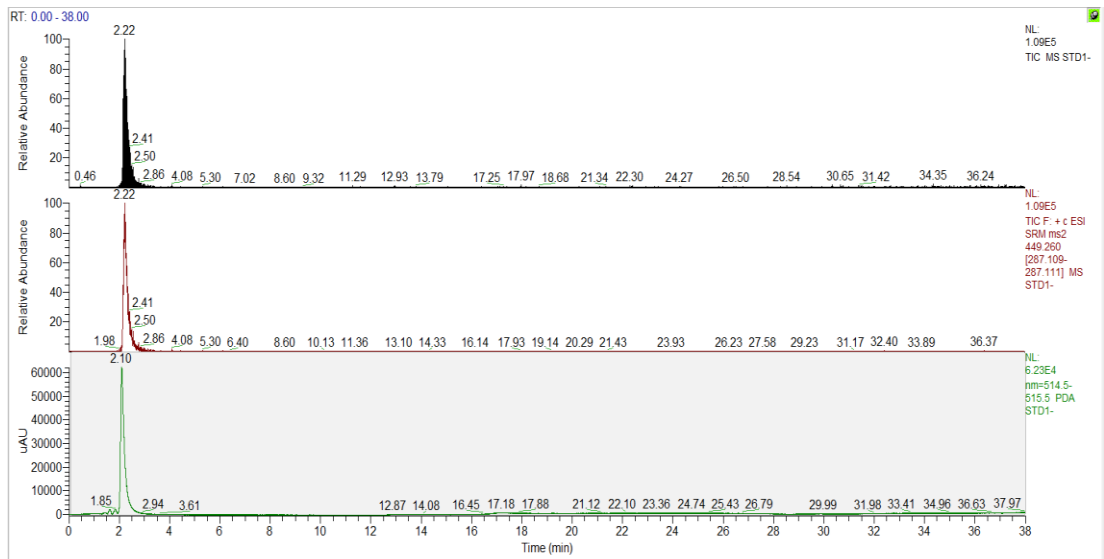


Kromatogram 1. Metot 1 ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları

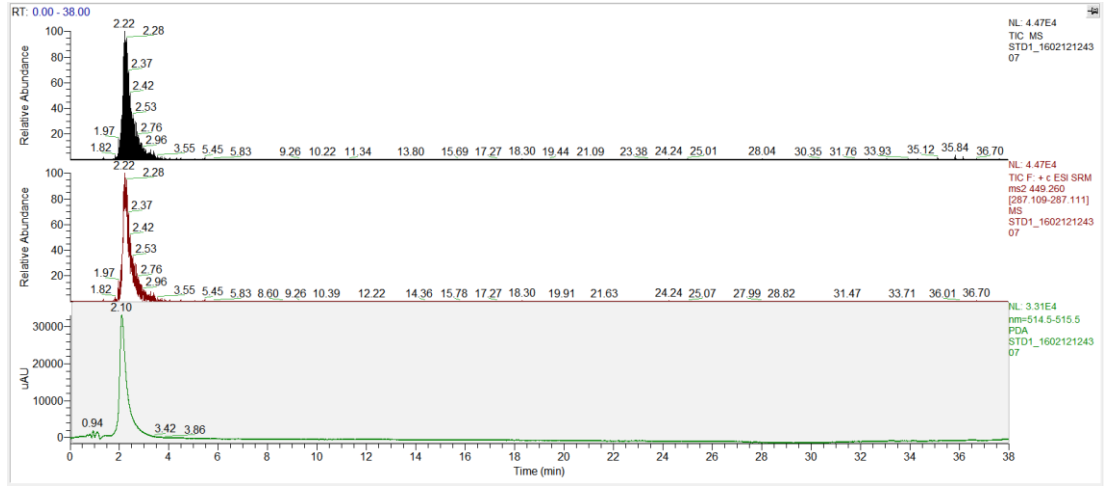


Kromatogram 2. Metot 1 ile *Morus nigra* meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları

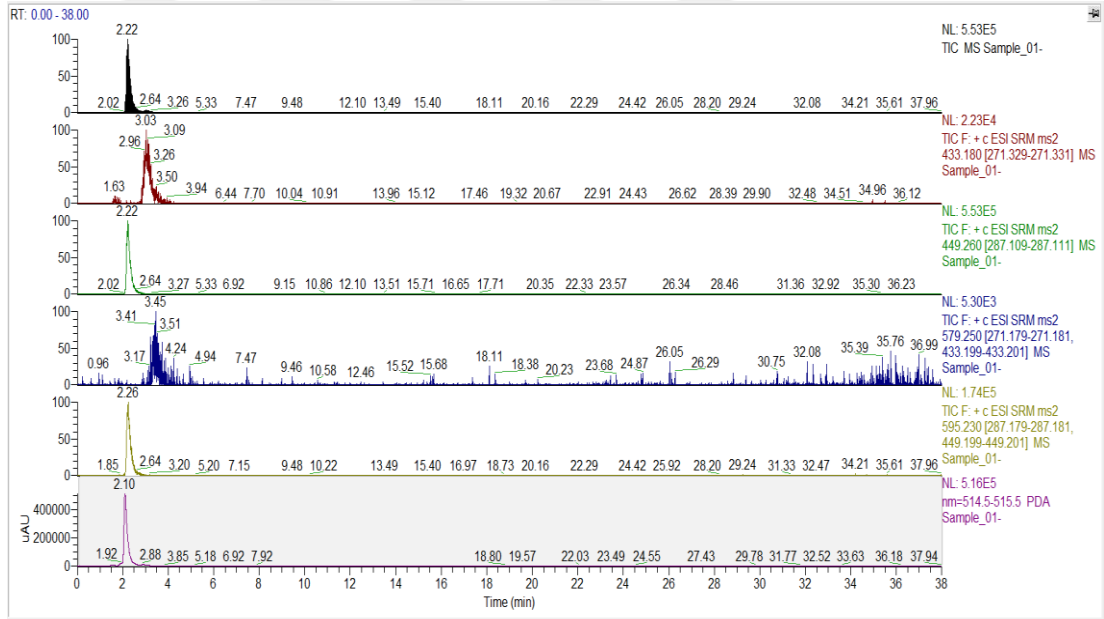
Metot 1 ile başarılı sonuç alınamaması üzerine literatürde yer alan diğer yöntemler denenmiştir. 38. dk'lık toplam analiz süresine sahip metot 2 (49) ve 16. dk'lık metot 3 (5) ile yapılan siyanidin-3-glikozit standardı ve *Morus nigra* meyve ekstresi LC-MS/MS analizi sonuçları Kromatogram 3, Kromatogram 4, Kromatogram 5, Kromatogram 6, Kromatogram 7, Kromatogram 8, Kromatogram 9 ve Kromatogram 10 ile gösterilmiştir.



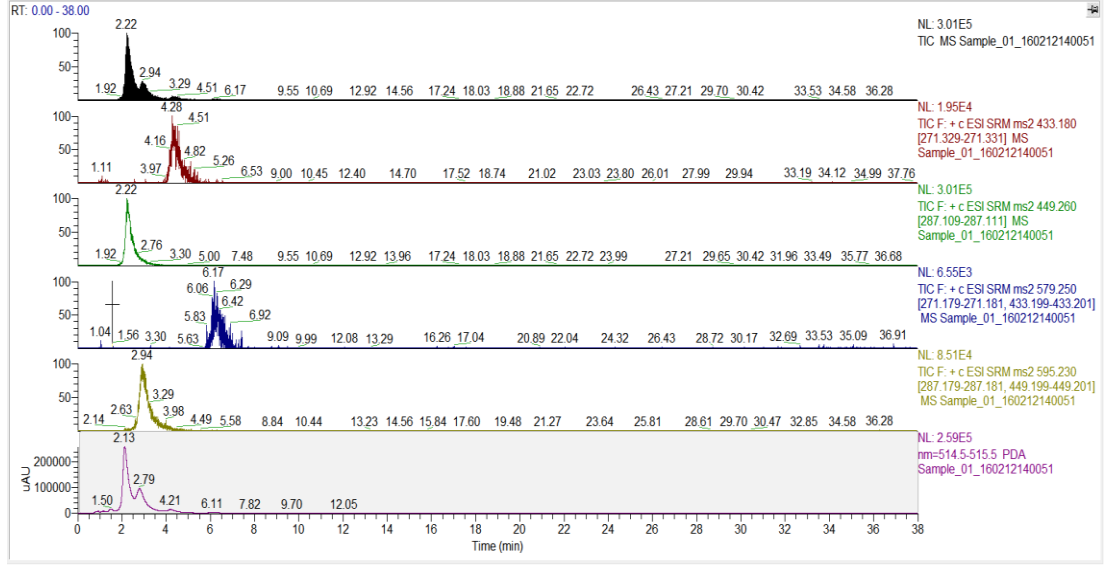
Kromatogram 3. 100 x 2.1 mm, 3 µm kolonda Metot 2 ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları



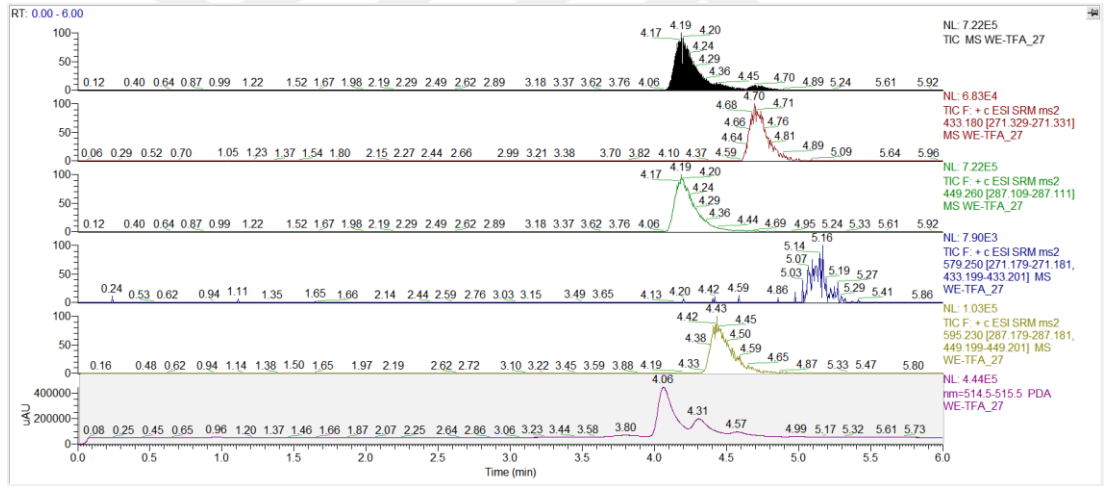
Kromatogram 4. 50 x 2.1 mm, 1,7 μ m kolonda Metot 2 ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları



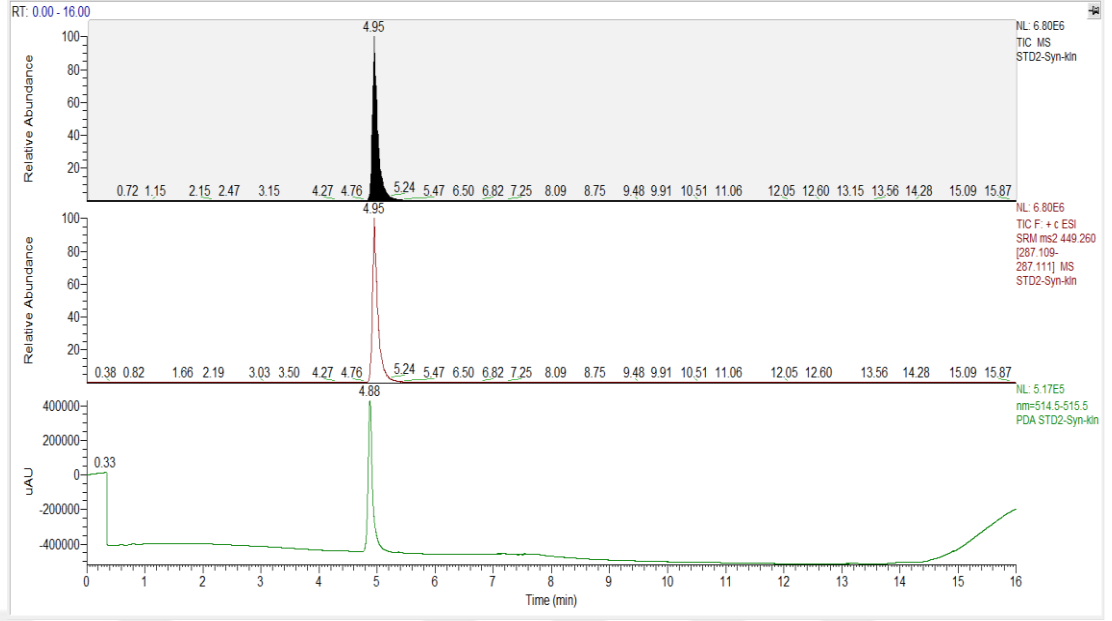
Kromatogram 5. 100 x 2.1 mm, 3 μ m kolonda Metot 2 ile *Morus nigra* meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları



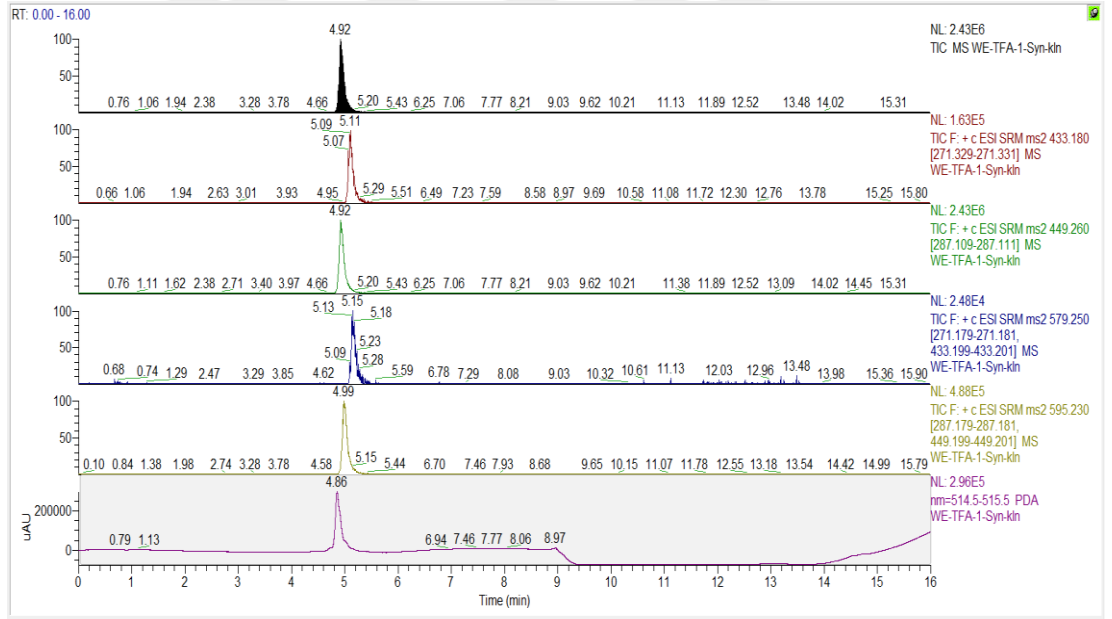
Kromatogram 6. 50 x 2.1 mm, 1,7 µm kolonda Metot 2 ile *Morus nigra* meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları



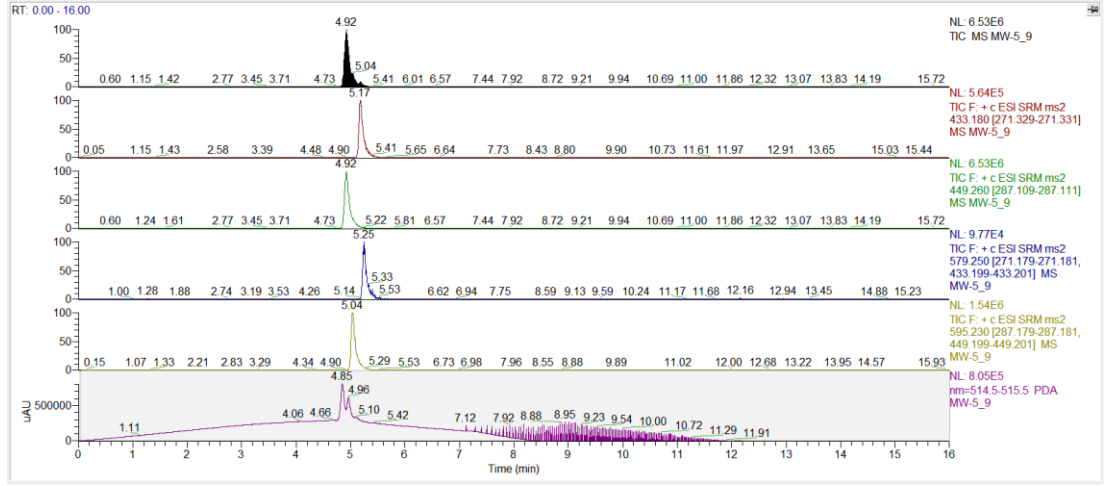
Kromatogram 7. 300 µl/dk akış hızında Metot 2 ile *Morus nigra* meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları



Kromatogram 8. Metot 3 ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları

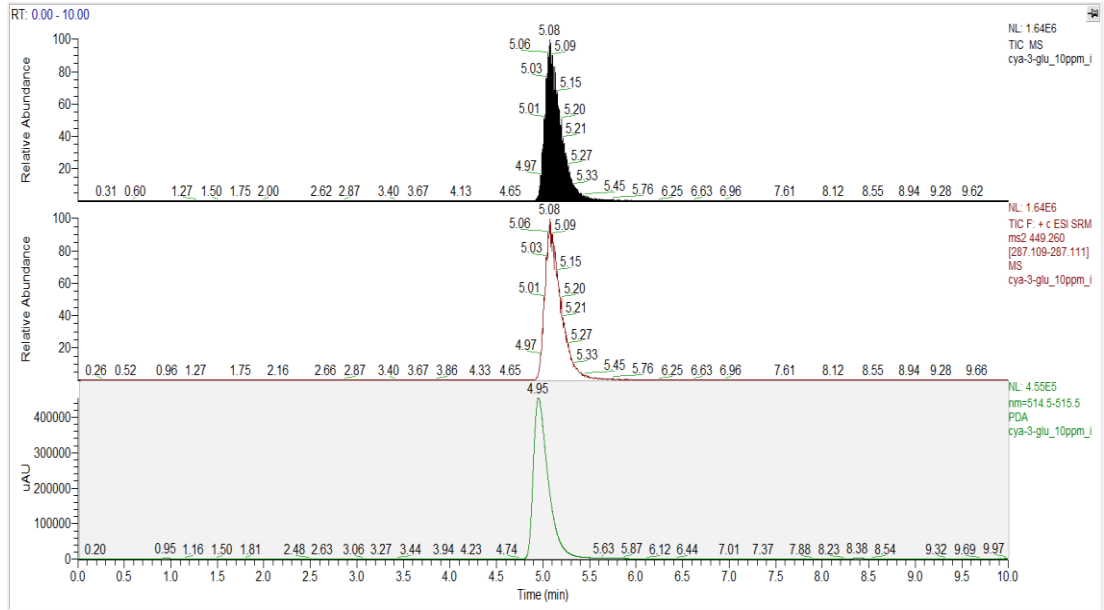


Kromatogram 9. Metot 3 ile *Morus nigra* meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları

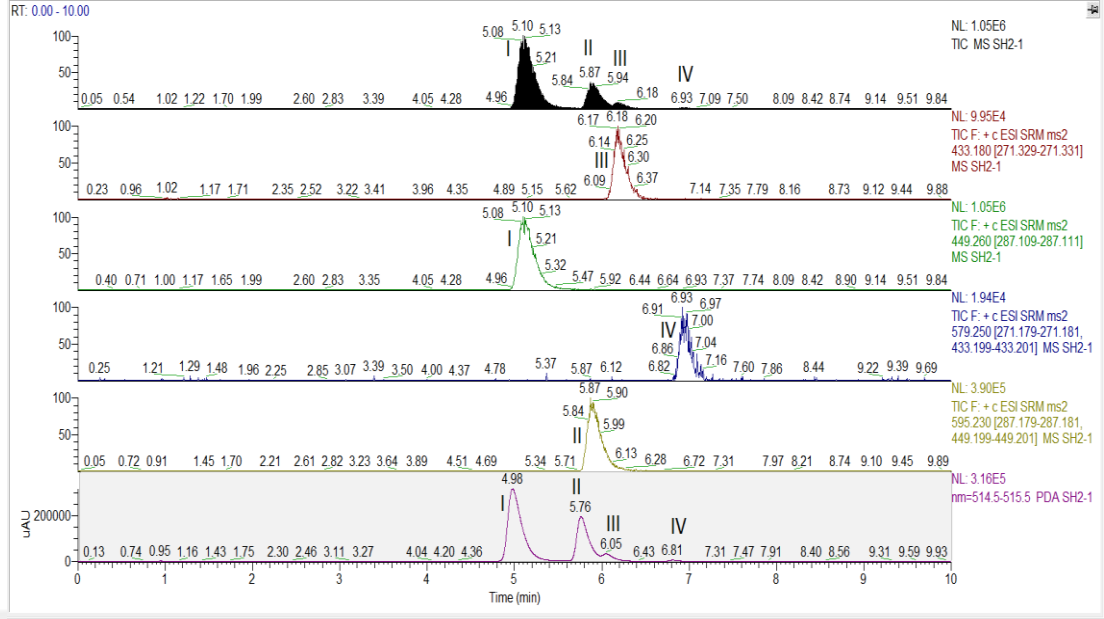


Kromatogram 10. 40 °C kolon fırın sıcaklığında Metot 3 ile *Morus nigra* meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları

50 x 2.1, 1.7 µm kolon ile dört antosiyanın molekülünün analizinin de gerçekleştirildiği, mobil faz gradient akış şeması ve 10dk. toplam analiz süresi ile özgün bir analiz metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen LC-MS/MS analiz metodu ile siyanidin-3-glikozit standardı ve *Morus nigra* meyve ekstresi analizi sonuçları Kromatogram 11 ve Kromatogram 12 ile gösterilmiştir.



Kromatogram 11. Geliştirilen analiz metodu ile siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları



Kromatogram 12. Geliştirilen analiz metodu ile *Morus nigra* meyve ekstresi MS ve DAD kromatogramları

I:siyanidin-3-glikozit, II:siyanidin-3-rutinozit
III:pelargonidin-3-glikozit, IV: pelargonidin-3-rutinozit

4.2.3. Konvansiyonel ekstraksiyonlara ait bulgular

Antosiyanince zengin ekstre eldesine yönelik olarak konvansiyonel ekstraksiyon çalışmaları orbital çalkalayıcı ve ultrasonik banyo ile yürütülmüştür. Çözücü karışımında yer alacak asidin seçimi amacıyla formik asit, hidroklorik asit ve trifloroasetik asit ile ultrasonik banyo kullanılarak liyofilize ve taze drog ile ön çalışmalar yapılmıştır. En yüksek toplam antosiyanin miktarını sağlayan asit olarak trifloroasetik asit ekstraksiyon çözücüsü karışımlarında kullanılmıştır (Tablo 10).

Tablo 10. 70:29:1 (etanol:su:asit) çözücü ekstraksiyonu ön çalışmaları

<i>Morus nigra</i> meyveleri	Asit	Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
		Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	Standart Sapma	%RSD
Liyofilize drog	Hidroklorik asit	3,39	3,35	3,35	3,36	0,02	0,73
Liyofilize drog	Formik asit	6,89	6,90	6,91	6,90	0,01	0,11
Liyofilize drog	Trifloroasetik asit	9,43	9,47	9,42	9,44	0,02	0,26
Taze drog	Formik asit	6,55	6,63	6,65	6,61	0,05	0,81
Taze drog	Trifloroasetik asit	8,80	8,72	8,66	8,73	0,07	0,82

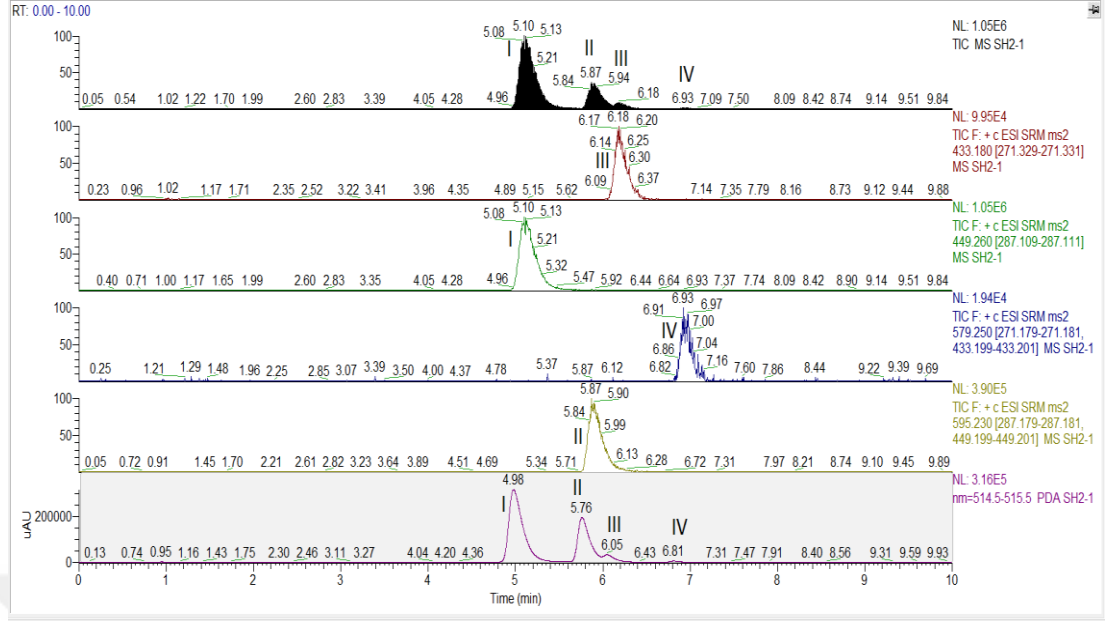
siy-3-gliE: siyanidin-3-glikozit eşdeğeri

Orbital çalkalayıcı ile 70:29:1 etanol:su:TFA ekstraksiyonuna ait toplam fenol, flavonoit, antosiyanin miktarları ve LC-MS/MS antosiyanin miktar tayini sonuçları Tablo 11’de mg/g kuru ekstre olarak verilmiş, MS ve DAD kromatogramları Kromatogram 13 ile gösterilmiştir.

Tablo 11. Orbital çalkalayıcı ekstresi miktar tayinleri

Orbital çalkalayıcı ekstraksiyonu	Spektrofotometrik analizler					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	%RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	17,16	17,27	17,20	17,21	0,06	0,34
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	2,08	2,02	2,15	2,08	0,06	3,02
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre	9,93	9,88	9,80	9,87	0,07	0,69
Orbital çalkalayıcı ekstraksiyonu	LC/MS-MS analizleri					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	%RSD
Siyanidin-3-glikozit mg/g ekstre	6,87	6,90	6,90	6,89	0,02	0,25
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre	10,88	10,95	10,94	10,93	0,04	0,32

GAE: gallik asit eşdeğeri, KE: kersetin eşdeğeri, siy-3-gliE: siyanidin-3-glikozit eşdeğeri



Kromatogram 13. Orbital çalkalayıcı ekstresi MS ve 515 nm DAD kromatogramları

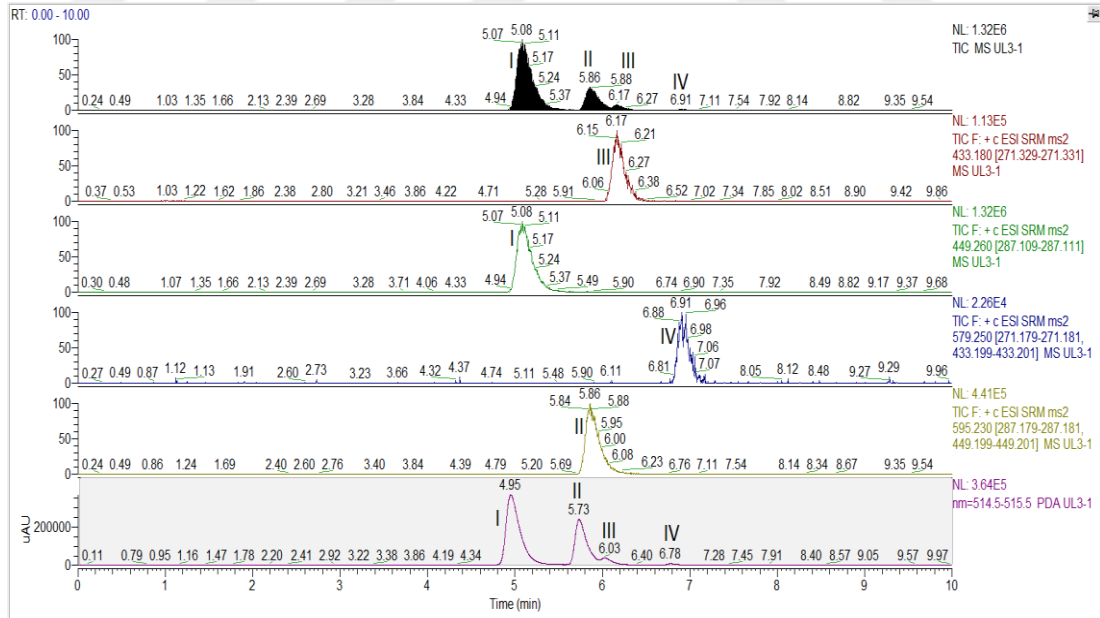
I: siyanidin-3-glikozit, II:siyanidin-3-rutinozit,
 III:pelargonidin-3-glikozit, IV: pelargonidin-3-rutinozit

Ultrasonik banyo ile 70:29:1 etanol:su:TFA ekstraksiyonuna ait toplam fenol, flavonoit, antosiyanin miktarları ve LC-MS/MS antosiyanin miktar tayini sonuçları Tablo 12’de mg/g kuru ekstre olarak verilmiş, MS ve DAD kromatogramları Kromatogram 14 ile gösterilmiştir.

Tablo 12. Ultrasonik banyo ekstresi miktar tayinleri

Ultrasonik banyo ekstraksiyonu	Spektrofotometrik analizler					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	Standart Sapma	%RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	19,38	19,63	19,53	19,51	0,13	0,66
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	3,48	3,55	3,49	3,51	0,04	1,06
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre	11,64	11,41	11,56	11,54	0,12	1,03
Orbital çalkalayıcı ekstraksiyonu	LC/MS-MS analizleri					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	Standart Sapma	%RSD
Siyanidin-3-glikozit mg/g ekstre	7,74	7,85	7,85	7,81	0,06	0,80
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre	12,55	12,75	12,78	12,69	0,12	0,98

GAE: gallik asit eşdeğeri, KE: kersetin eşdeğeri, siy-3-gliE: siyanidin-3-glikozit eşdeğeri

**Kromatogram 14.** Ultrasonik banyo ekstresi MS ve DAD kromatogramları

I: siyanidin-3-glikozit, II: siyanidin-3-rutinozid

III: pelargonidin-3-glikozit, IV: pelargonidin-3-rutinozid

4.2.4. İleri Ekstraksiyon Teknolojileri Bulguları

4.2.4.1. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu Optimizasyonu

Morus nigra meyve droğunun süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu 40-80 °C sıcaklık; 120-200 bar basınç ve %2-8 co-solvan ilavesi aralığında yanıt yüzey metodolojisi Box-Benhken dizaynı kullanılarak tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca optimize edilmiştir. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu optimizasyonu deneysel sonuçları Tablo 13, dizaynın işaret ettiği optimum ekstraksiyon koşulları Tablo 14 ve yanıt yüzey metodolojisi istatistiksel model sonuçları Tablo 15 ile sunulmuştur.

Tablo 13. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon optimizasyonu deneysel sonuçları

Std	Run	Block	Factor 1 A:Temperature C	Factor 2 B:Pressure bar	Factor 3 C:Co-solvent %	Response 1 Tyrosinase inhibiton IC50
2	1	Block 1	40.00	120.00	5.00	1373
4	2	Block 1	40.00	160.00	2.00	1750
3	3	Block 1	60.00	200.00	8.00	344
1	4	Block 1	80.00	120.00	2.00	1420
5	5	Block 1	40.00	160.00	8.00	728
6	6	Block 1	60.00	160.00	5.00	792
7	7	Block 1	40.00	200.00	5.00	1057

Tablo 14. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu optimum koşulları

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Temperature	is in range	40	80	1	1	3
Pressure	is in range	120	200	1	1	3
Co-solvent	is in range	2	8	1	1	3
Tyrosinase inhib	minimize	344	1750	1	1	3

Solutions						
Number	Temperature	Pressure	Co-solvent	Tyrosinase inh	Desirability	
1	58.81	198.61	7.89	328.549	1.000	Selected
2	75.49	136.86	7.96	343.229	1.000	

Tablo 15. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon optimizasyonunda yanıt yüzey metodolojisi istatistiksel model sonuçları

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F	significant
Model	1.398E+006	5	2.795E+005	485.25	0.0345		significant
A-Temperature	1.514E+005	1	1.514E+005	262.81	0.0392		
B-Pressure	72801.57	1	72801.57	126.39	0.0565		
C-Co-solvent	5.222E+005	1	5.222E+005	906.67	0.0211		
AB	4128.14	1	4128.14	7.17	0.2276		
AC	0.000	0					
BC	31411.06	1	31411.06	54.53	0.0857		
Residual	576.00	1	576.00				
Cor Total	1.398E+006	6					

The Model F-value of 485.25 implies the model is significant. There is only a 3.45% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A, C are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Std. Dev.	24.00	R-Squared	0.9996
Mean	1066.29	Adj R-Squared	0.9975
C.V. %	2.25	Pred R-Squared	N/A
PRESS	N/A	Adeq Precision	62.737

Case(s) with leverage of 1.0000: Pred R-Squared and PRESS statistic not defined

Çalışılan aralıktaki tüm süperkritik karbondioksit ekstrelerinde hedef bileşen grubu olan antosiyanin miktarı çok düşük (<1 mg/g kuru ekstre) kalmıştır. Süperkritik karbondioksit sistemi ile antosiyanin ekstraksiyonunun sağlanabildiği koşulların tespit edilebilmesi amacıyla süperkritik akışkanı gerekli polarlığa taşıyabileceği öngörülen daha yüksek co-solvan (etanol) ilavesi ile denemeler yapılmıştır. 200 bar basınç, 40 ve 60 °C sıcaklık, %30 ve %40 co-solvan ilavesi değerleri ve 60 dk. dinamik ekstraksiyon süresi ile ek çalışmalar yürütülmüş, sonuçlar Şekil 8, Tablo 16 ve Kromatogram 15 ile gösterilmiştir.

Design-Expert® Software

Tyrosinase inhibiton

1750

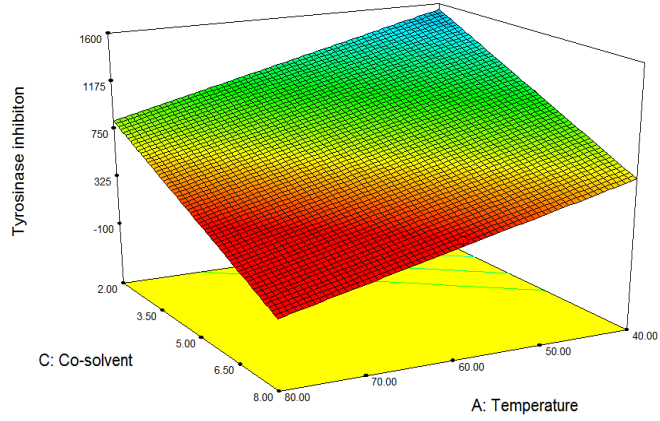
344

X1 = A: Temperature

X2 = C: Co-solvent

Actual Factor

B: Pressure = 200.00

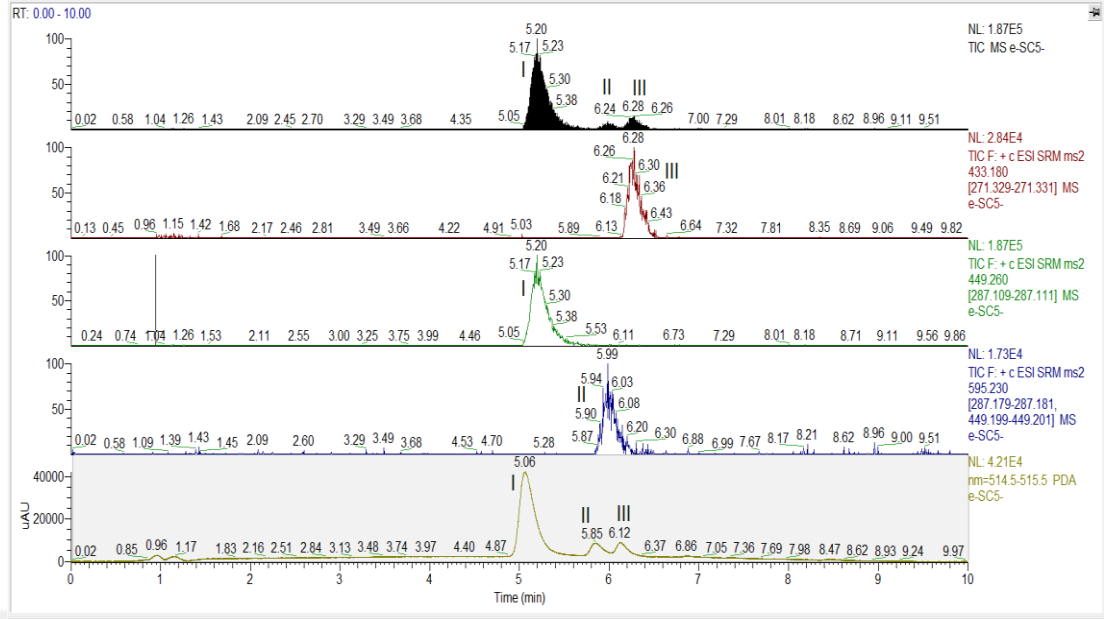


Şekil 8. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda anlamlı etkiye sahip parametrelerin tirozinaz inhibitör aktivite açısından sonuçlarını gösteren 3D diyagram

Tablo 16. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ek çalışmaları

Süperkritik CO ₂ ekstraksiyonu ek çalışmaları			Spektrofotometrik toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
Basınç (bar)	Sıcaklık (°C)	Co-solvan oranı (%)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
200	60	40	2,49	2,49	2,33	2,44	0,09	3,74
200	60	30	0,94	0,92	0,91	0,92	0,01	1,31
200	60	10	-	-	-	*	-	-
200	40	30	1,25	1,25	1,24	1,25	0,01	0,40
			LC-MS/MS toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
Basınç (bar)	Sıcaklık (°C)	Co-solvan oranı (%)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
200	60	40	1,54	1,51	1,48	1,51	0,03	1,96
200	60	30	0,75	0,77	0,76	0,76	0,01	1,07
			LC-MS/MS siyanidin-3-glikozit miktarı					
Basınç (bar)	Sıcaklık (°C)	Co-solvan oranı (%)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g ekstre	Standart Sapma	% RSD
200	60	40	0,68	0,69	0,68	0,68	0,00	0,40
200	60	30	1,30	1,29	1,27	1,29	0,01	1,11

*: tespit edilemedi, siy-3-gliE: siyanidin-3-glikozit eşdeğeri



Kromatogram 15. 200 bar, 60 °C, %40 co-solvan koşulları ile süperkritik CO₂ ekstresi MS ve DAD kromatogramı

I: siyanidin-3-glikozit, II: siyanidin-3-rutinozit
III: pelargonidin-3-glikozit, IV: pelargonidin-3-rutinozit

4.2.4.2. Subkritik Su Ekstraksiyon Optimizasyonu

Morus nigra meyve droğunun subkritik su ekstraksiyonu 150 bar basınç ile 40-80 °C sıcaklık; 20-60 dk. ekstraksiyon süresi ve 2-6 mL/dk. akış hızı aralığında yanıt yüzey metodolojisi Box-Benken dizaynı kullanılarak toplam fenol, flavonoit, antosiyanin miktarı, LC-MS/MS antosiyanin miktarı ve tirozinaz inhibitör aktivite cevapları uyarınca optimize edilmiştir. Elde edilen optimum ekstraksiyon süresi ve akış hızı değerlerinde 100 °C ve 120 °C 'de subkritik alan ekstraksiyonları yapılmıştır. Subkritik su ekstraksiyon sistemine ait deneysel sonuçlar Tablo 17, dizaynın işaret ettiği optimum ekstraksiyon koşulları Tablo 18, Tablo 19 ve Tablo 20, yanıt yüzey metodolojisi istatistiksel model sonuçları Tablo 21 ile sunulmuştur.

Tablo 17. Subkritik su ekstraksiyon optimizasyonu deneysel sonuçları

Run	Block	Factor 1 A:temperature C	Factor 2 B:time min	Factor 3 C:flow rate ml/dk	Response 1 total phenol	Response 2 total flavonoid	Response 3 total anthocyanin	Response 4 LC-MS anthocyanin	Response 5 Tyrosinase inhib %
1	Block 1	60.00	60.00	2.00	28.65	2.59	7.73	9.45	65
2	Block 1	80.00	60.00	4.00	22.94	3.10	1.21	0.52	45
3	Block 1	40.00	60.00	4.00	19.83	1.83	4.38	3.55	52
4	Block 1	60.00	20.00	6.00	19.64	1.99	2.57	1.96	37
5	Block 1	60.00	40.00	4.00	24.13	2.38	5.83	6.53	56
6	Block 1	80.00	40.00	2.00	27.26	2.59	4.98	4.90	57
7	Block 1	80.00	20.00	4.00	24.97	2.29	5.82	6.32	60
8	Block 1	60.00	40.00	4.00	22.75	2.39	3.93	5.64	56
9	Block 1	60.00	40.00	4.00	21.56	2.21	4.20	3.42	50
10	Block 1	80.00	40.00	6.00	26.51	2.98	2.23	0.96	51
11	Block 1	40.00	40.00	2.00	17.26	1.47	3.26	3.53	43
12	Block 1	40.00	40.00	6.00	17.02	1.49	3.44	3.74	40
13	Block 1	60.00	20.00	2.00	21.66	1.79	2.88	2.70	40
14	Block 1	40.00	20.00	4.00	16.54	1.51	3.64	3.87	51
15	Block 1	60.00	60.00	6.00	18.61	1.92	4.60	3.69	52

Tablo 18. Subkritik su ekstraksiyonunda toplam fenol ve antosiyanin miktarı ile LC-MS/MS antosiyanin miktarı açısından optimum koşullar

Notes for sub-critical water							
<ul style="list-style-type: none"> Design (Actual) <ul style="list-style-type: none"> Summary Graph Columns Evaluation Analysis <ul style="list-style-type: none"> total phenol (Analyze) total flavonoid total anthocyanin (A) LC-MS anthocyanin Tyrosinase inhibitor Optimization <ul style="list-style-type: none"> Numerical Graphical Point Prediction 							
Criteria		Solutions		Graphs			
Solutions 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 1							
Constraints							
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance	
temperature	is in range	40	80	1	1	3	
time	is in range	20	60	1	1	3	
flow rate	is in range	2	6	1	1	3	
total phenol	maximize	16.5419	28.6466	1	1	3	
Solutions							
Number	temperature	time	flow rate	total phenol	Desirability	Selected	
1	64.84	59.76	2.00	28.66	1.000	Selected	
2	63.83	59.25	2.01	28.66	1.000		
3	64.02	59.54	2.01	28.67	1.000		

Notes for sub-critical water							
<ul style="list-style-type: none"> Design (Actual) <ul style="list-style-type: none"> Summary Graph Columns Evaluation Analysis <ul style="list-style-type: none"> total phenol (Analyze) total flavonoid (Analyze) total anthocyanin (A) LC-MS anthocyanin Tyrosinase inhibitor Optimization <ul style="list-style-type: none"> Numerical Graphical Point Prediction 							
Criteria		Solutions		Graphs			
Solutions 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 1							
Constraints							
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance	
temperature	is in range	40	80	1	1	3	
time	is in range	20	60	1	1	3	
flow rate	is in range	2	6	1	1	3	
total anthocyanin	maximize	1.2064	7.73474	1	1	3	
Solutions							
Number	temperature	time	flow rate	total anthocyanin	Desirability	Selected	
1	58.45	59.98	2.01	7.74	1.000	Selected	
2	57.51	59.97	2.00	7.74	1.000		
3	58.66	59.99	2.00	7.74	1.000		

Notes for sub-critical water							
<ul style="list-style-type: none"> Design (Actual) <ul style="list-style-type: none"> Summary Graph Columns Evaluation Analysis <ul style="list-style-type: none"> total phenol (Analyze) total flavonoid (Analyze) total anthocyanin (A) LC-MS anthocyanin Tyrosinase inhibitor Optimization <ul style="list-style-type: none"> Numerical Graphical Point Prediction 							
Criteria		Solutions		Graphs			
Solutions 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15							
Constraints							
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance	
temperature	is in range	40	80	1	1	3	
time	is in range	20	60	1	1	3	
flow rate	is in range	2	6	1	1	3	
LC-MS anthocyanin	maximize	0.52	9.45	1	1	3	
Solutions							
Number	temperature	time	flow rate	LC-MS anthocyanin	Desirability	Selected	
1	58.84	60.00	2.00	9.44	0.999	Selected	
2	58.68	60.00	2.00	9.44	0.999		
3	59.04	60.00	2.00	9.44	0.999		

Tablo 19. Subkritik su ekstraksiyonunda toplam flavonoit miktarı açısından optimum koşullar

Constraints		Lower	Upper	Lower	Upper	
Name	Goal	Limit	Limit	Weight	Weight	Importance
temperature	is in range	40	80	1	1	3
time	is in range	20	60	1	1	3
flow rate	is in range	2	6	1	1	3
total flavonoid	maximize	1.46735	3.10256	1	1	3

Solutions		Number	temperature	time	flow rate	total flavonoid	Desirability
		1	<u>79.69</u>	<u>59.97</u>	<u>3.77</u>	<u>3.11</u>	<u>1.000</u> Selected
		2	79.97	52.05	3.81	3.10	1.000
		3	79.58	55.08	4.06	3.11	1.000

Tablo 20. Subkritik su ekstraksiyonunda tirozinaz inhibitör aktivite açısından optimum koşullar

Constraints		Lower	Upper	Lower	Upper	
Name	Goal	Limit	Limit	Weight	Weight	Importance
temperature	is in range	40	80	1	1	3
time	is in range	20	60	1	1	3
flow rate	is in range	2	6	1	1	3
Tyrosinase inhib	maximize	37	65	1	1	3

Solutions		Number	temperature	time	flow rate	Tyrosinase inh	Desirability
		1	<u>57.50</u>	<u>59.95</u>	<u>2.66</u>	<u>65.2147</u>	<u>1.000</u> Selected
		2	59.75	59.91	2.62	65.0616	1.000
		3	56.96	59.90	2.89	65.0884	1.000

Tablo 21. Subkritik su ekstraksiyon optimizasyonunda yanıt yüzey metodolojisi istatistiksel model sonuçları

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response 5 Tyrosinase inhibiton

ANOVA for Response Surface Reduced Cubic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	865.35	10	86.54	10.82	0.0173	significant
<i>A-temperature</i>	156.25	1	156.25	19.54	0.0115	
<i>B-time</i>	400.00	1	400.00	50.03	0.0021	
<i>C-flow rate</i>	20.25	1	20.25	2.53	0.1867	
AB	64.00	1	64.00	8.00	0.0474	
AC	2.25	1	2.25	0.28	0.6239	
BC	25.00	1	25.00	3.13	0.1517	
C ²	83.60	1	83.60	10.46	0.0319	
A ² B	364.50	1	364.50	45.59	0.0025	
AB ²	66.13	1	66.13	8.27	0.0452	
B ² C	6.13	1	6.13	0.77	0.4309	
Residual	31.98	4	8.00			
<i>Lack of Fit</i>	7.98	2	3.99	0.33	0.7504	not significant
<i>Pure Error</i>	24.00	2	12.00			
Cor Total	897.33	14				

The Model F-value of 10.82 implies the model is significant. There is only a 1.73% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, AB, C², A²B, AB² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Design-Expert® Software

total phenol

28.6466

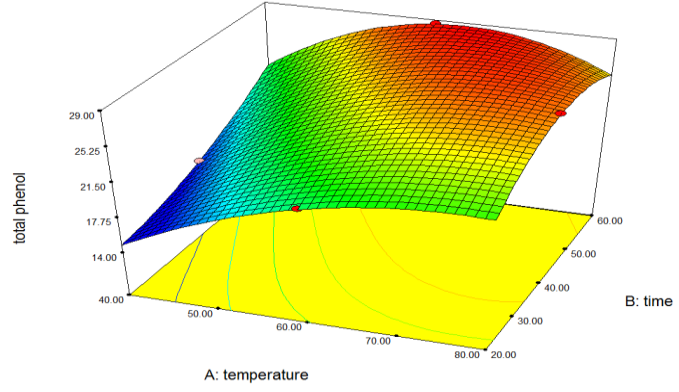
16.5419

X1 = A: temperature

X2 = B: time

Actual Factor

C: flow rate = 2.00



Design-Expert® Software

total flavonoid

3.10256

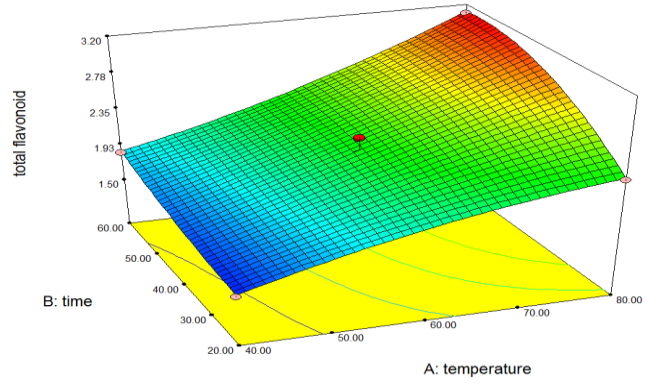
1.46735

X1 = A: temperature

X2 = B: time

Actual Factor

C: flow rate = 4.00



Design-Expert® Software

total anthocyanin

7.73474

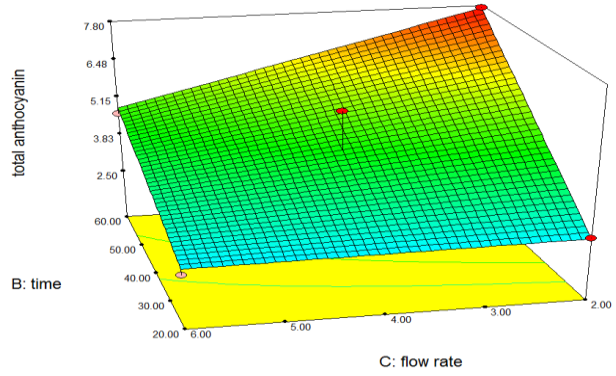
1.2064

X1 = B: time

X2 = C: flow rate

Actual Factor

A: temperature = 60.00



Design-Expert® Software

LC-MS anthocyanin

9.45

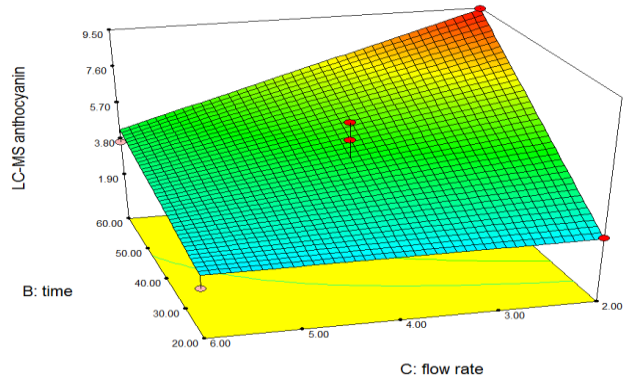
0.52

X1 = B: time

X2 = C: flow rate

Actual Factor

A: temperature = 60.00



Şekil 9. Subkritik su ekstraksiyonunda anlamlı etkiye sahip parametrelerin biyoaktif bileşenler açısından sonuçlarını gösteren 3D diyagramlar

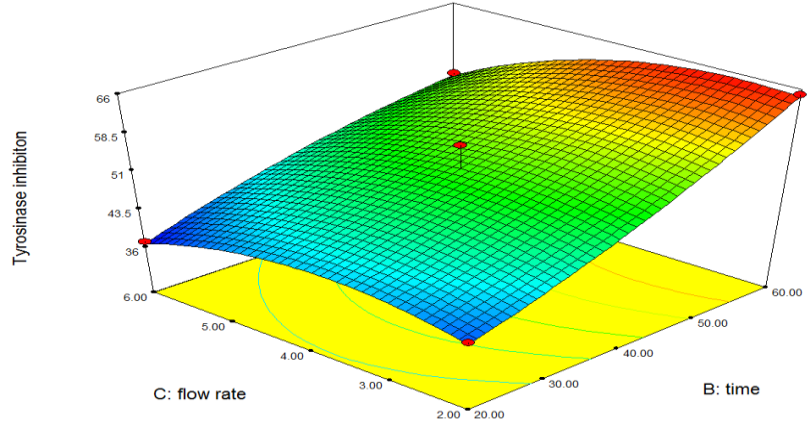
Design-Expert® Software

Tyrosinase inhibiton



X1 = B: time
X2 = C: flow rate

Actual Factor
A: temperature = 60.00



Şekil 10. Subkritik su ekstraksiyonunda optimum sıcaklıkta (60 °C) ekstraksiyon zamanı ile akış hızı etkisini gösteren 3D diyagram

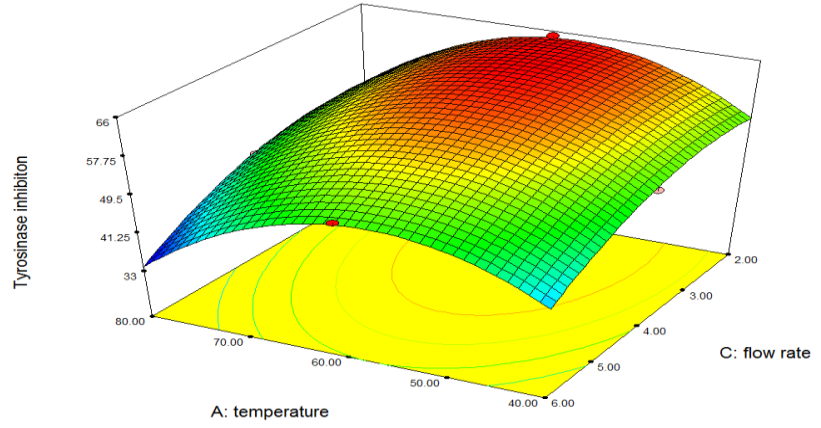
Design-Expert® Software

Tyrosinase inhibiton



X1 = A: temperature
X2 = C: flow rate

Actual Factor
B: time = 60.00



Şekil 11. Subkritik su ekstraksiyonunda optimum ekstraksiyon süresinde (60 dk) ekstraksiyon zamanı ile akış hızı etkisini gösteren 3D diyagram

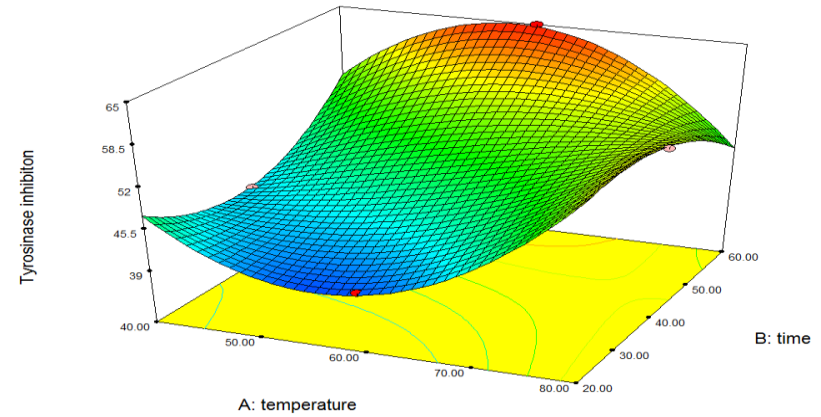
Design-Expert® Software

Tyrosinase inhibiton



X1 = A: temperature
X2 = B: time

Actual Factor
C: flow rate = 2.00

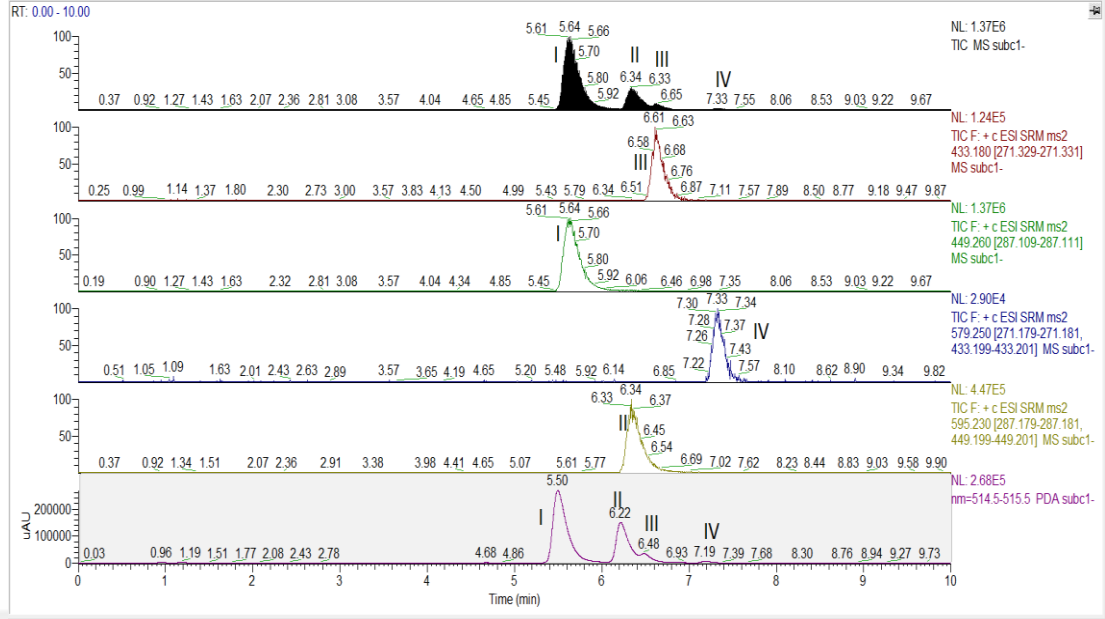


Şekil 12. Subkritik su ekstraksiyonunda optimum akış hızında (2 mL/dk) sıcaklık ile ekstraksiyon süresi etkisini gösteren 3D diyagram

Tablo 22. Subkritik su ekstraksiyonu optimum ekstraheleri

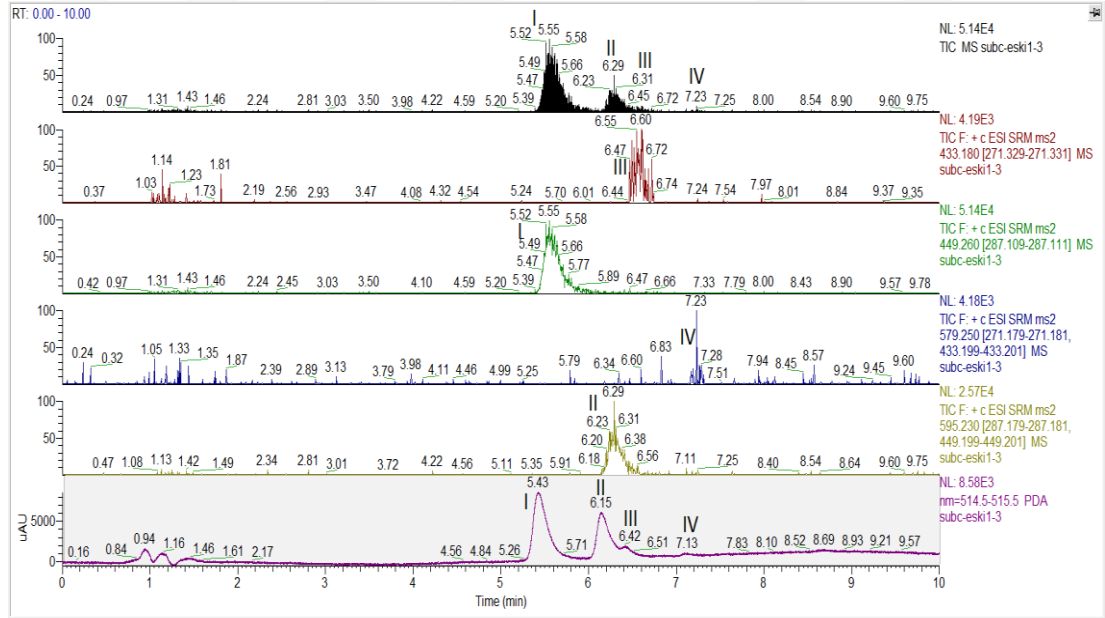
Subkritik su ekstraksiyonu optimum ekstraheleri			Spektrofotometrik toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre					
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Akış hızı (mL/dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
60	60	2	29,69	28,90	27,35	28,65	1,19	4,15
80	60	4	23,03	22,85	22,94	22,94	0,09	0,39
100	60	2	46,06	46,57	47,48	46,71	0,72	1,54
120	60	2	39,67	38,11	41,25	39,67	1,56	3,95
			Spektrofotometrik toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre					
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Akış hızı (mL/dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
60	60	2	2,47	2,65	2,64	2,59	0,10	3,81
80	60	4	3,12	3,09	3,10	3,10	0,01	0,42
100	60	2	7,59	7,09	7,34	7,34	0,25	3,47
120	60	2	4,67	4,64	4,60	4,64	0,02	0,60
			Spektrofotometrik toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Akış hızı (mL/dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
60	60	2	7,84	7,73	7,63	7,73	0,11	1,37
80	60	4	1,25	1,20	1,16	1,21	0,04	3,73
100	60	2	0,75	0,74	0,73	0,74	0,01	1,46
120	60	2	-	-	-	*	-	-
			LC-MS/MS toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Akış hızı (mL/dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
60	60	2	9,40	9,48	9,48	9,45	0,05	0,48
80	60	4	0,52	0,52	0,51	0,52	0,01	1,38
100	60	2	1,03	1,05	1,05	1,05	0,01	1,19
			LC-MS/MS siyanidin-3-glikozit miktarı					
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Akış hızı (mL/dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
60	60	2	5,96	6,00	6,02	5,99	0,03	0,46
80	60	4	0,48	0,47	0,47	0,47	0,01	0,37
100	60	2	0,80	0,81	0,81	0,81	0,01	1,01

*: tayin edilmedi (<1mg/g)



Kromatogram 16. 60 °C, 60 dk, 2 mL/dk. koşulları ile subkritik su ekstresi MS ve DAD kromatogramı

I: siyanidin-3-glikozit, II: siyanidin-3-rutinozit
 III: pelargonidin-3-glikozit, IV: pelargonidin-3-rutinozit



Kromatogram 17. 100 °C, 60 dk, 2 mL/dk. koşulları ile subkritik su ekstresi MS ve DAD kromatogramı

I: siyanidin-3-glikozit, II: siyanidin-3-rutinozit
 III: pelargonidin-3-glikozit, IV: pelargonidin-3-rutinozit

4.2.4.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Optimizasyonu

Morus nigra meyve droğunun mikrodalga destekli ekstraksiyonu 35 °C’de 1:50 drog:çözücü oranı ile 300-700 watt mikrodalga gücü, %0-70 etanol oranı ve 5-15 dk ekstraksiyon süresi aralığında yanıt yüzey metodolojisi Box-Benhken dizaynı kullanılarak toplam fenol, flavonoit, antosiyanin miktarı, LC-MS/MS antosiyanin miktarı ve tirozinaz inhibitör aktivite cevapları uyarınca optimize edilmiştir. Elde edilen optimum ekstraksiyon koşullarında 1:10 drog:çözücü oranı ile ek ekstraksiyonları yapılmıştır. Subkritik su ekstraksiyon sistemine ait deneysel sonuçlar Tablo 23, dizaynın işaret ettiği optimum ekstraksiyon koşulları Tablo 24, Tablo 25, Tablo 26, Tablo 27 ve yanıt yüzey metodolojisi istatistiksel model sonuçları Tablo 28 ile sunulmuştur.

Mikrodalga gücü 300, 500 ve 700 watt; etanol oranı %0, %35 ve %70; ekstraksiyon süresi 5, 10 ve 15 dk. değerleri ile çalışılmıştır. Tüm ekstraksiyonlar 35°C sabit sıcaklıkta, 1:50 drog:çözücü oranında ve çözücü karışımına %1 TFA ilaveli olarak çalışılmıştır.

Tablo 23. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu deneysel sonuçları

Run	Block	Factor 1 A:power watt	Factor 2 B:ethanol conc %	Factor 3 C:time min	Response 1 total phenol	Response 2 total flavonoid	Response 3 total anthocyan	Response 4 LC-MS anthocyan	Response 5 Tyrosinase Inh
1	Block 1	500.00	35.00	10.00	23.88	2.25	10.02	11.92	74
2	Block 1	500.00	70.00	5.00	23.83	2.37	10.06	12.1	64
3	Block 1	700.00	35.00	15.00	23.34	2.58	9.32	8.41	60
4	Block 1	500.00	35.00	10.00	24.67	2.35	10.62	12.63	80
5	Block 1	300.00	70.00	10.00	24.91	2.66	10.87	12.73	70
6	Block 1	500.00	0.00	5.00	24.11	2.67	9.74	11.77	58
7	Block 1	700.00	35.00	5.00	24.49	2.42	9.32	11.7	76
8	Block 1	300.00	35.00	15.00	24.5	2.43	9.6	11.71	68
9	Block 1	500.00	35.00	10.00	25.35	2.46	9.93	12.33	78
10	Block 1	500.00	70.00	15.00	24.47	2.6	9.26	10.48	63
11	Block 1	300.00	35.00	5.00	25.01	2.53	9.68	10.75	61
12	Block 1	700.00	70.00	10.00	24.43	2.7	8.9	9.99	61
13	Block 1	500.00	0.00	15.00	21.05	2.63	8.82	9.99	60
14	Block 1	700.00	0.00	10.00	22.92	2.83	9.71	11.76	61
15	Block 1	300.00	0.00	10.00	22.19	2.59	7.53	8.16	55

Tablo 24. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenol miktarı açısından optimum koşullar

Constraints		Lower	Upper	Lower	Upper		
Name	Goal	Limit	Limit	Weight	Weight	Importance	
power	is in range	300	700	1	1	3	
ethanol conc.	is in range	0	70	1	1	3	
time	is in range	5	15	1	1	3	
total phenol	maximize	21.05	25.35	1	1	3	

Solutions		power	ethanol conc.	time	total phenol	Desirability	
Number							
1		300.00	70.00	15.00	25.3308	0.996	Selected
2		300.00	70.00	14.90	25.33	0.995	
3		300.00	70.00	14.79	25.3289	0.995	

Tablo 25. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid miktarı açısından optimum koşullar

Constraints		Lower	Upper	Lower	Upper		
Name	Goal	Limit	Limit	Weight	Weight	Importance	
power	is in range	300	700	1	1	3	
ethanol conc.	is in range	0	70	1	1	3	
time	is in range	5	15	1	1	3	
total flavonoid	maximize	2.25	2.83	1	1	3	

Solutions		power	ethanol conc.	time	total flavonoid	Desirability	
Number							
1		699.97	0.01	9.03	2.83013	1.000	Selected
2		699.03	0.11	9.57	2.83011	1.000	
3		692.05	0.85	14.66	2.83556	1.000	

Tablo 26. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarı ve LC-MS/MS antosiyanin miktarı açısından optimum koşullar

The screenshot displays the optimization results for microwave-assisted extraction. The interface includes a sidebar with navigation options like Design, Summary, Graph Columns, Evaluation, Analysis, Optimization, Numerical, Graphical, and Point Prediction. The main window displays 'Constraints' and 'Solutions' tables. The 'Solutions' table shows three optimal solutions based on Desirability, with Solution 1 being the selected one.

Constraints							
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance	
power	is in range	300	700	1	1	3	
ethanol conc.	is in range	0	70	1	1	3	
time	is in range	5	15	1	1	3	
total anthocyanin	maximize	7.53	10.87	1	1	3	

Solutions						
Number	power	ethanol conc.	time	total anthocyanin	Desirability	
1	<u>300.48</u>	<u>70.00</u>	<u>9.90</u>	<u>10.87</u>	<u>1.000</u>	<u>Selected</u>
2	300.04	69.99	9.95	10.87	1.000	
3	300.07	70.00	9.98	10.87	1.000	

Constraints							
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance	
power	is in range	300	700	1	1	3	
ethanol conc.	is in range	0	70	1	1	3	
time	is in range	5	15	1	1	3	
LC-MS anthocyanin	maximize	8.16	12.73	1	1	3	

Solutions						
Number	power	ethanol conc.	time	LC-MS anthocyanin	Desirability	
1	<u>344.15</u>	<u>66.17</u>	<u>11.46</u>	<u>12.7953</u>	<u>1.000</u>	<u>Selected</u>
2	317.29	54.35	10.88	12.7718	1.000	
3	329.37	53.84	11.25	12.7795	1.000	

Tablo 27. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda tirozinaz inhibitör aktivite açısından optimum koşullar

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
power	is in range	300	700	1	1	3
ethanol conc.	is in range	0	70	1	1	3
time	is in range	5	15	1	1	3
Tyrosinase Inhib	maximize	55	80	1	1	3

Solutions						
Number	power	ethanol conc.	time	Tyrosinase Inhib	Desirability	
1	532.54	38.90	9.68	77.6358	0.905	Selected

1 Solutions found

Tablo 28. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonunda yanıt yüzey metodolojisi istatistiksel model sonuçları

ANOVA for Response Surface Reduced Cubic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F	Significant
Model	843.52	10	84.35	13.28	0.0119		significant
A-power	12.25	1	12.25	1.93	0.2373		
B-ethanol conc.	72.00	1	72.00	11.33	0.0281		
C-time	0.25	1	0.25	0.039	0.8524		
AB	56.25	1	56.25	8.85	0.0409		
AC	132.25	1	132.25	20.81	0.0103		
A ²	103.39	1	103.39	16.27	0.0157		
B ²	391.08	1	391.08	61.55	0.0014		
C ²	123.85	1	123.85	19.49	0.0116		
A ² C	12.50	1	12.50	1.97	0.2334		
AB ²	12.50	1	12.50	1.97	0.2334		
Residual	25.42	4	6.35				
Lack of Fit	6.75	2	3.37	0.36	0.7344		not significant
Pure Error	18.67	2	9.33				
Cor Total	868.93	14					

The Model F-value of 13.28 implies the model is significant. There is only a 1.19% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case B, AB, AC, A², B², C² are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

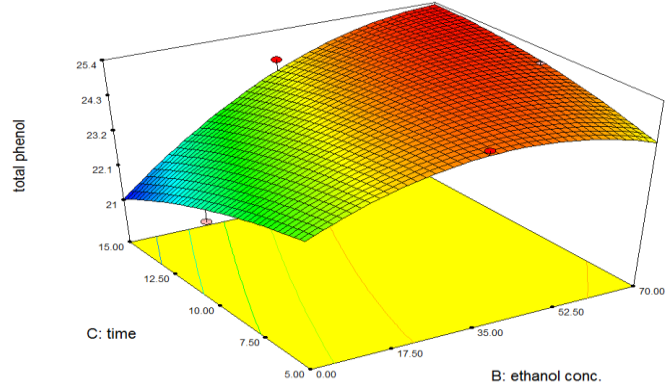
The "Lack of Fit F-value" of 0.36 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure

Design-Expert® Software

total phenol
25.35
21.05

X1 = B: ethanol conc.
X2 = C: time

Actual Factor
A: power = 300.00

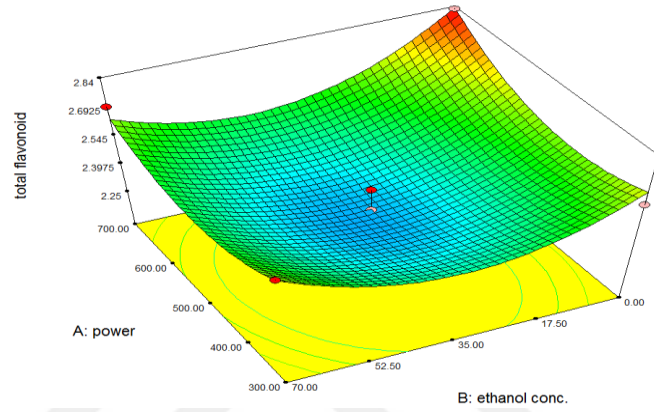


Design-Expert® Software

total flavonoid
2.83
2.25

X1 = A: power
X2 = B: ethanol conc.

Actual Factor
C: time = 10.00

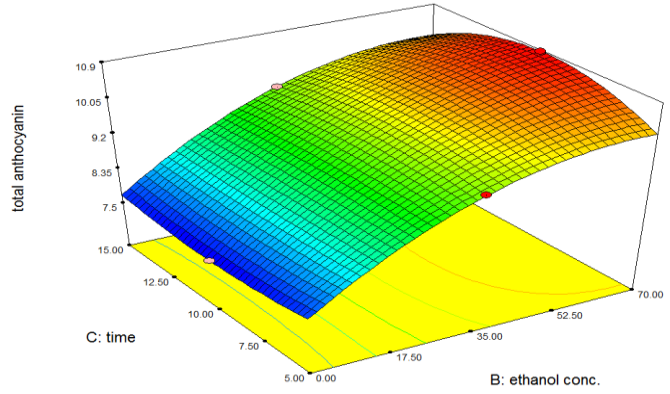


Design-Expert® Software

total anthocyanin
10.87
7.53

X1 = B: ethanol conc.
X2 = C: time

Actual Factor
A: power = 300.00

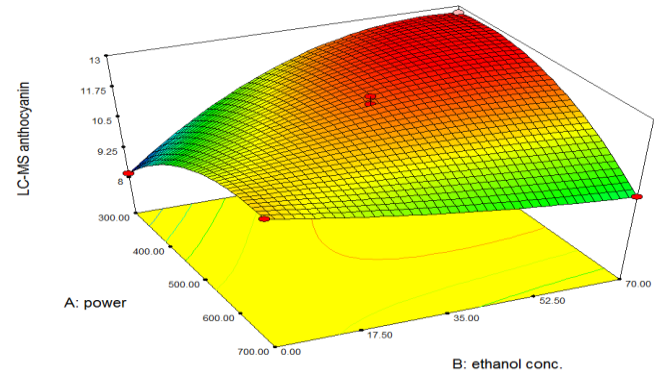


Design-Expert® Software

LC-MS anthocyanin
12.73
8.16

X1 = A: power
X2 = B: ethanol conc.

Actual Factor
C: time = 10.00



Şekil 13. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda anlamlı etkiye sahip parametrelerinin biyoaktif bileşenler açısından sonuçları (3D diyagramlar)

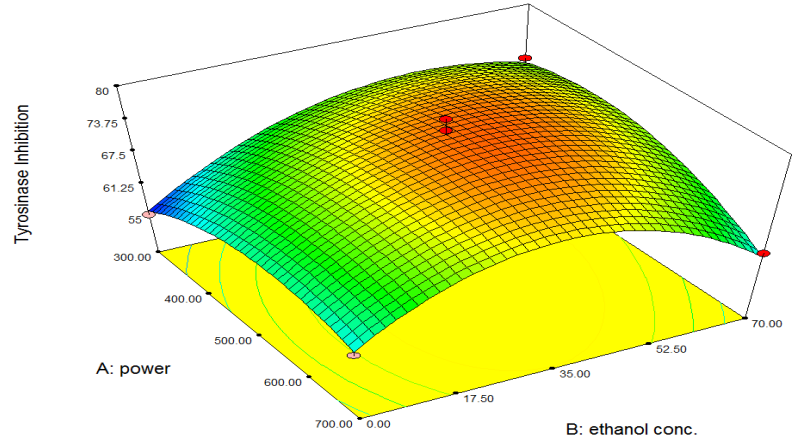
Design-Expert® Software

Tyrosinase Inhibition



X1 = A: power
X2 = B: ethanol conc.

Actual Factor
C: time = 10.00



Şekil 14. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum ekstraksiyon süresinde (10 dk) mikrodalga gücü ile etanol oranı etkisini gösteren 3D diyagram

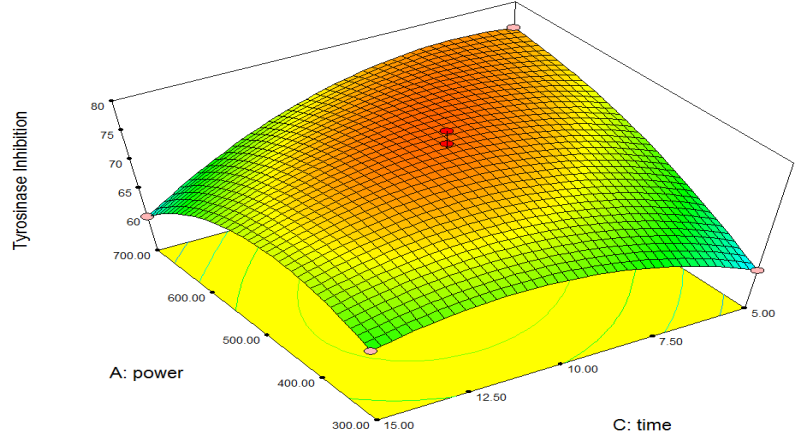
Design-Expert® Software

Tyrosinase Inhibition



X1 = A: power
X2 = C: time

Actual Factor
B: ethanol conc. = 35.00



Şekil 15. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum etanol oranında (%35) mikrodalga gücü ile ekstraksiyon süresi etkisini gösteren 3D diyagram

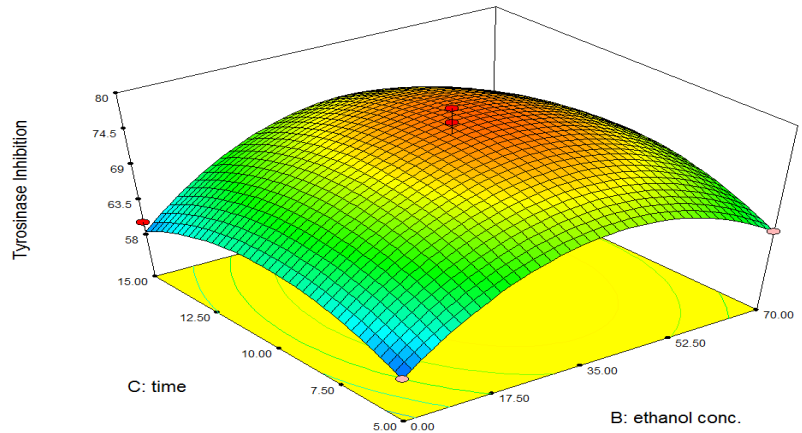
Design-Expert® Software

Tyrosinase Inhibition



X1 = B: ethanol conc.
X2 = C: time

Actual Factor
A: power = 500.00



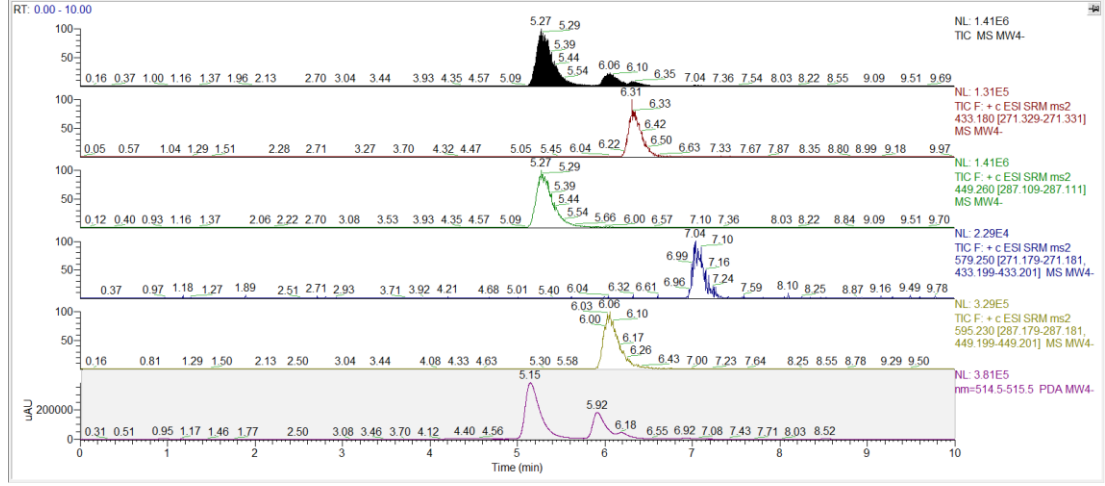
Şekil 16. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum mikrodalga gücünde (500 watt) etanol oranı ile ekstraksiyon süresi etkisini gösteren 3D diyagram

Tablo 29. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimum ekstreleri (drog:çözücü 1:50)

Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimum ekstreleri			Spektrofotometrik toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	24,32	25,23	24,46	24,67	0,49	1,98
300	70	10	24,63	25,30	24,80	24,91	0,35	1,40
700	0	10	22,67	23,82	22,27	22,92	0,80	3,50
			Spektrofotometrik toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	2,30	2,41	2,34	2,35	0,05	2,28
300	70	10	2,65	2,59	2,73	2,66	0,07	2,63
700	0	10	2,73	2,87	2,89	2,83	0,09	3,02
			Spektrofotometrik toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	10,45	11,02	10,39	10,62	0,35	3,30
300	70	10	10,55	11,06	11,01	10,87	0,28	2,57
700	0	10	9,70	9,70	9,74	9,71	0,02	0,24
			LC-MS/MS toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	12,71	12,50	12,69	12,63	0,11	0,89
300	70	10	12,82	12,69	12,66	12,73	0,09	0,69
700	0	10	11,76	11,77	11,74	11,76	0,01	0,13
			LC-MS/MS siyanidin-3-glikozit miktarı					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	8,57	8,48	8,56	8,54	0,05	0,57
300	70	10	8,84	8,79	8,77	8,80	0,04	0,40
700	0	10	7,97	7,96	7,98	7,97	0,01	0,09

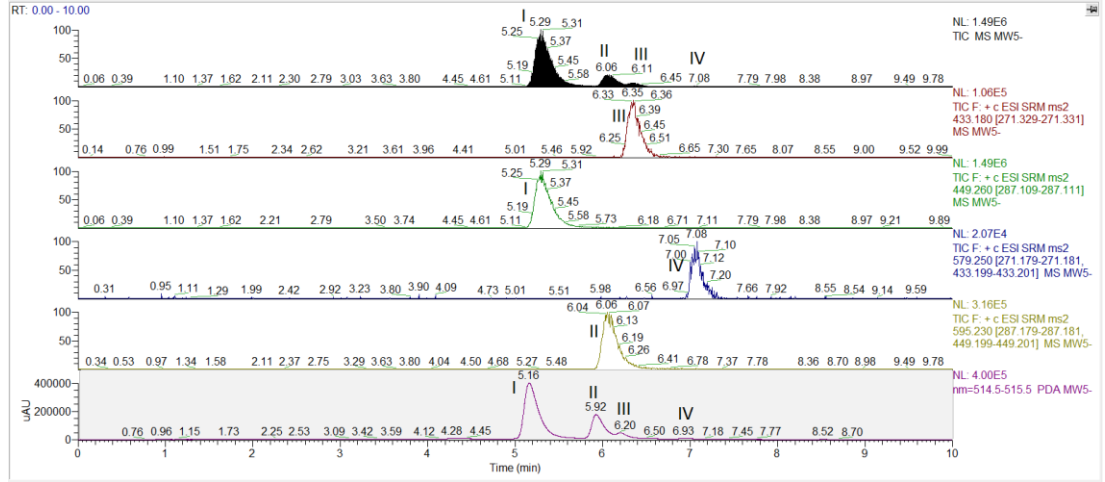
Tablo 30. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimum ekstreler (drog:çözücü 1:10)

Mikrodalga destekli ekstraksiyon ek optimum ekstreler				Spektrofotometrik toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Drog: çözücü	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
300	70	15	1:50	25,15	25,64	25,55	25,45	0,26	1,03
500	35	10	1:10	20,31	21,98	20,85	21,05	0,85	4,03
500	70	5	1:10	27,77	27,94	27,42	27,71	0,27	0,96
700	35	15	1:10	27,13	27,17	26,74	27,01	0,24	0,87
				Spektrofotometrik toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Drog: çözücü	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	1:10	2,55	2,63	2,68	2,62	0,07	2,48
500	70	5	1:10	3,12	3,11	3,18	3,14	0,04	1,26
700	35	15	1:10	2,67	2,54	2,70	2,64	0,08	3,22
				Spektrofotometrik toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Drog: çözücü	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	1:10	11,32	11,27	11,36	11,32	0,05	0,40
500	70	5	1:10	11,84	11,86	11,91	11,87	0,03	0,29
700	35	15	1:10	10,99	10,99	10,89	10,96	0,06	0,53
				LC-MS/MS toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Drog: çözücü	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	1:10	13,22	13,32	13,28	13,28	0,05	0,38
500	70	5	1:10	14,84	14,75	14,86	14,82	0,06	0,39
700	35	15	1:10	13,53	13,53	13,46	13,51	0,04	0,32
				LC-MS/MS siyanidin-3-glikozit miktarı					
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Drog: çözücü	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
500	35	10	1:10	8,82	8,88	8,86	8,85	0,03	0,36
500	70	5	1:10	9,97	9,86	9,91	9,91	0,05	0,54
700	35	15	1:10	9,04	9,05	9,04	9,04	0,01	0,08



Kromatogram 18. 500 watt, %35 etanol, 10 dk koşulları ile mikrodalga destekli ekstre mikrodalga destekli MS ve DAD kromatogramı

I: siyanidin-3-glikozit, II: siyanidin-3-rutinozid
III: pelargonidin-3-glikozit, IV: pelargonidin-3-rutinozid



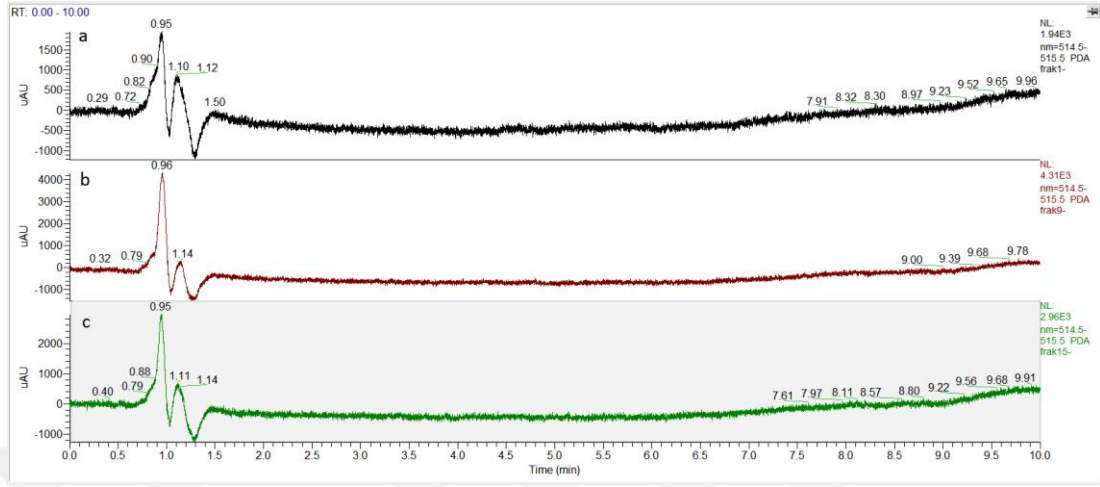
Kromatogram 19. 300 watt, %70 etanol, 10 dk koşulları ile mikrodalga destekli ekstre MS ve DAD kromatogramı

I: siyanidin-3-glikozit, II: siyanidin-3-rutinozid
III: pelargonidin-3-glikozit, IV: pelargonidin-3-rutinozid

4.2.4.4. Aktiviteden Sorumlu Bileşenlerin Tespitine Yönelik Fraksiyonlama Çalışmalarına ait Bulgular

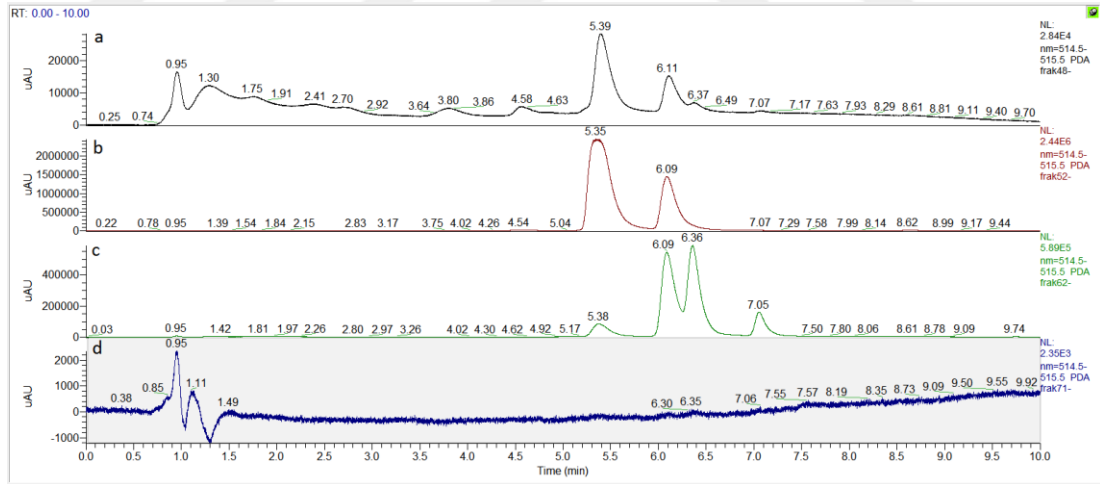
Aktiviteden sorumlu bileşenlerin tayinine yönelik olarak ters faz silika (RP C18) kolon ile mobil faz olarak ise değişen oranlarda su:metanol karışımları (100:0'dan %10'luk değişimler ile 0:100'e kadar) kullanarak fraksiyonlama

çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen fraksiyonların LC-MS/MS analiz sonuçları Kromatogram 20, Kromatogram 21, Kromatogram 22 ve Tablo 31 ile gösterilmiştir.



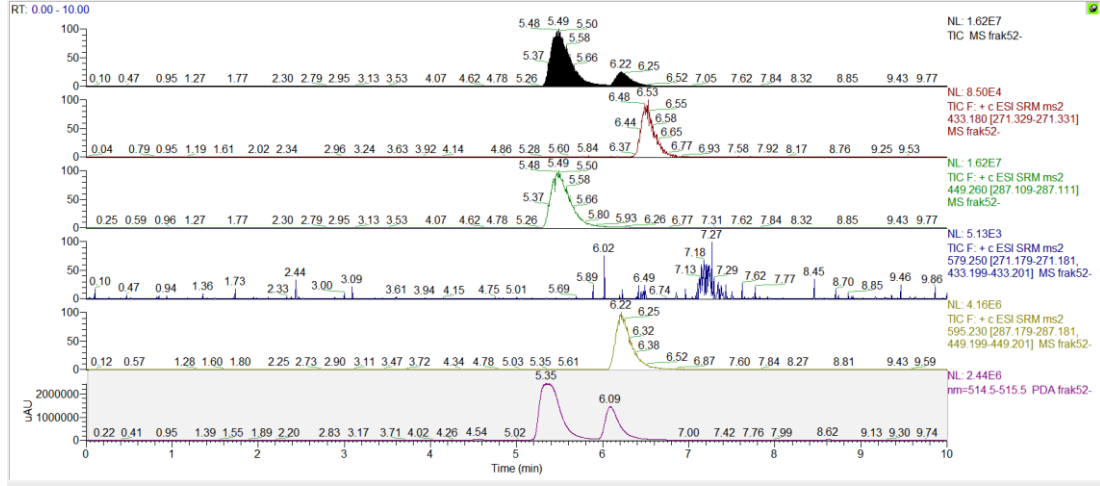
Kromatogram 20. *Morus nigra* meyve ekstresi RP-silika fraksiyonlarına ait 515 nm DAD kromatogramları

a: fraksiyon 1, b: fraksiyon 9, c: fraksiyon 15



Kromatogram 21. *Morus nigra* meyve ekstresi RP-silika fraksiyonlarına ait 515 nm DAD kromatogramları

a: fraksiyon 48, b: fraksiyon 52, c: fraksiyon 62, d: fraksiyon 71



Kromatogram 22. Aktiviteden sorumlu fraksiyonun (Fraksiyon 52) MS ve DAD kromatogramları

Tablo 31. *Morus nigra* meyve ekstresi RP-silika fraksiyonlarının LC-MS/MS analizi

<i>Morus nigra</i> meyve ekstresi RP-silika fraksiyonları	LC-MS/MS toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Fraksiyon 48	5,01	5,01	4,93	4,98	0,05	0,91
Fraksiyon 52	416,74	419,40	418,51	418,22	1,36	0,32
Fraksiyon 62	99,25	98,94	98,64	98,94	0,31	0,31
<i>Morus nigra</i> meyve ekstresi RP-silika fraksiyonları	LC-MS/MS siyanidin-3-glikozit miktarı					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Fraksiyon 48	3,84	3,83	3,81	3,83	0,02	0,49
Fraksiyon 52	292,66	293,59	293,05	293,10	0,47	0,16
Fraksiyon 62	9,14	9,00	9,07	9,07	0,07	0,78

4.2.4.5. Optimize Ekstraksiyon Sistemleri ile Antosiyanince Zengin Alternatif Kaynakların Araştırılmasına ait Bulgular

Antosiyanin bakımından zengin ekstre eldesine yönelik olarak optimizasyonu tamamlanan ekstraksiyon sistemleri ile farklı bitkisel droglar kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür. *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* bitkisinin herba ve *Raphanus sativus* 'Red Meat' bitkisinin kök drogları ile konvansiyonel ekstraksiyonlar ile subkritik su ekstraksiyonu ve mikrodalga destekli ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır, sonuçlar Tablo 32 ve Tablo 33 ile sunulmuştur.

Tablo 32. Optimize ekstraksiyon koşullarında antosiyanince zengin farklı bitkisel droglar (herba) ile çalışmalar

70:29:1 etanol:su:TFA Orbital çalkalayıcı ekstraksiyonu	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	22,68	23,24	22,56	22,83	0,36	1,59
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	1,69	1,56	1,71	1,66	0,08	4,95
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-giE/g ekstre	6,07	6,36	6,03	6,15	0,18	2,92
70:29:1 etanol:su:TFA Ultrasonik banyo ekstraksiyonu	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	27,15	28,34	27,01	27,50	0,73	2,65
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	2,69	2,62	2,73	2,68	0,05	2,04
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-giE/g ekstre	9,46	10,10	9,43	9,66	0,38	3,90
Optimize mikrodalga destekli ekstraksiyon	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	31,77	31,73	31,74	31,75	0,02	0,08
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	3,47	3,35	3,46	3,43	0,07	1,95
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-giE/g ekstre	11,75	11,73	11,83	11,77	0,05	0,43
Optimize subkritik su ekstraksiyonu	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	30,51	32,26	30,27	31,02	1,09	3,50
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	2,38	2,22	2,38	2,33	0,09	3,89
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-giE/g ekstre	8,21	8,53	8,27	8,34	0,17	2,04

Tablo 33. Optimize ekstraksiyon koşullarında antosiyanince zengin farklı bitkisel droglar (kök) ile çalışmalar

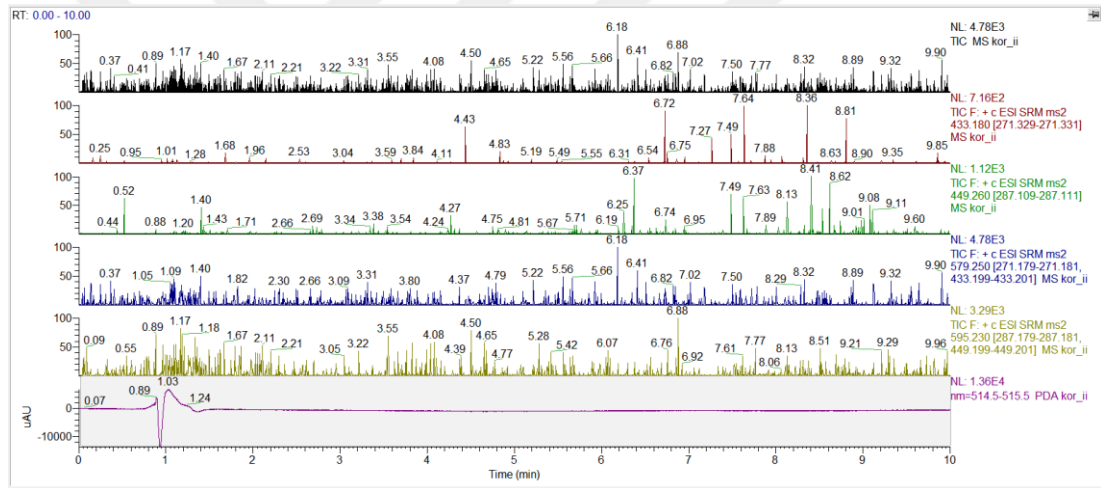
70:29:1 etanol:su:TFA Orbital çalkalayıcı ekstraksiyonu	<i>Raphanus sativus</i> 'Red Meat'					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	11,50	11,58	11,44	11,51	0,07	0,61
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	0,70	0,69	0,68	0,69	0,01	0,78
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-giE/g ekstre	3,69	3,50	3,79	3,66	0,15	3,98
70:29:1 etanol:su:TFA Ultrasonik banyo ekstraksiyonu	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	10,53	11,09	10,45	10,69	0,35	3,26
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	0,81	0,80	0,81	0,81	0,01	1,01
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-giE/g ekstre	2,97	3,33	3,06	3,12	0,19	5,95
Optimize mikrodalga destekli ekstraksiyon	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	14,03	14,31	13,97	14,10	0,18	1,30
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	1,05	1,03	1,03	1,03	0,01	0,90
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-giE/g ekstre	6,00	5,40	6,07	5,82	0,37	6,32
Optimize subkritik su ekstraksiyonu	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam fenol miktarı mg GAE/g ekstre	12,01	12,19	11,94	12,04	0,13	1,11
Toplam flavonoit miktarı mg KE/g ekstre	0,66	0,73	0,65	0,68	0,04	6,55
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-giE/g ekstre	1,66	1,76	1,76	1,73	0,06	3,45

4.2.4.6. Ekstraksiyon ve Analiz Validasyonu Çalışmaları

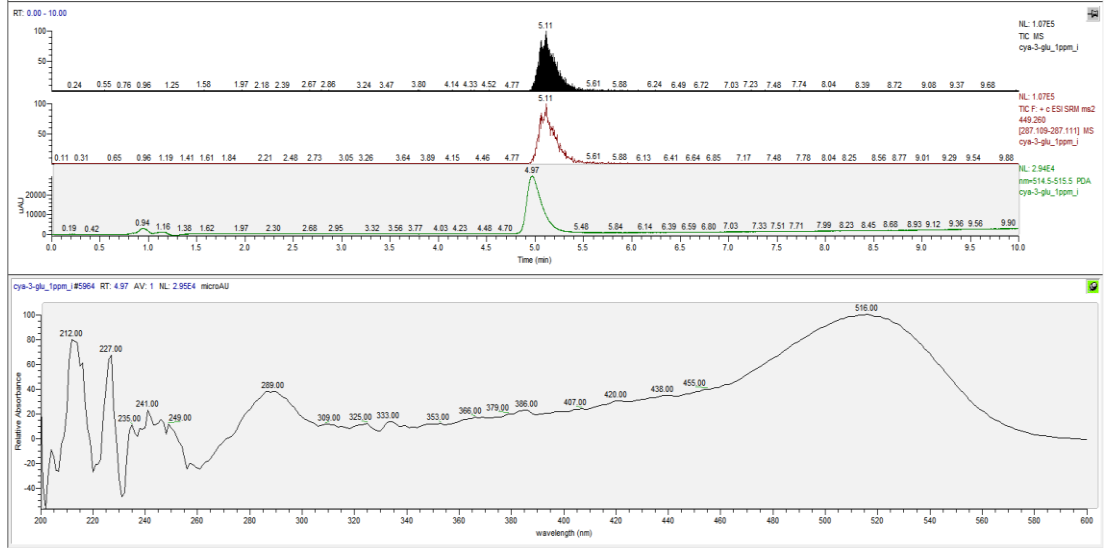
Ekstraksiyon ve analiz çalışmalarında kullanılan yöntemlerin geçerliliğinin gösterilmesine yönelik olarak validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Ekstraksiyon validasyonu amacıyla kör ekstraksiyon, ekstraksiyon tekrarlanabilirliği, ekstraksiyon geri kazanımı ve atılan kısımda miktar tayini çalışmaları yürütülmüştür. Analiz validasyonuna yönelik olarak linearite, tekrarlanabilirlik, gün içi stabilite ve günler arası stabilite çalışmaları yürütülmüştür.

Kör ekstraksiyon

Kör ekstraksiyon çalışması ve siyanidin-3-glikozit standardına ait analiz sonuçları Kromatogram 23 ve Kromatogram 24 ile gösterilmiştir.



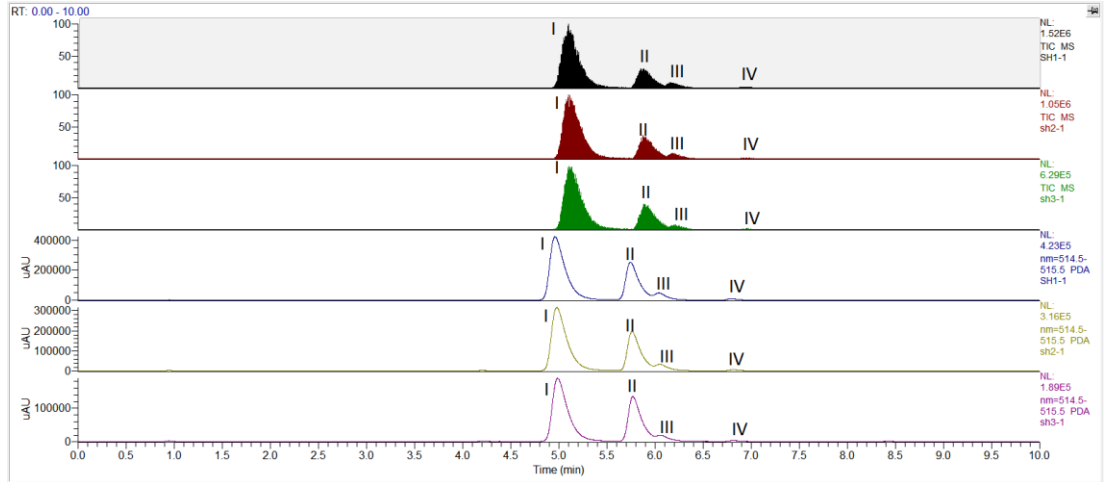
Kromatogram 23. Kör ekstraksiyon MS ve DAD kromatogramları



Kromatogram 24. Siyanidin-3-glikozit standardı MS ve DAD kromatogramları ile UV spektrumu

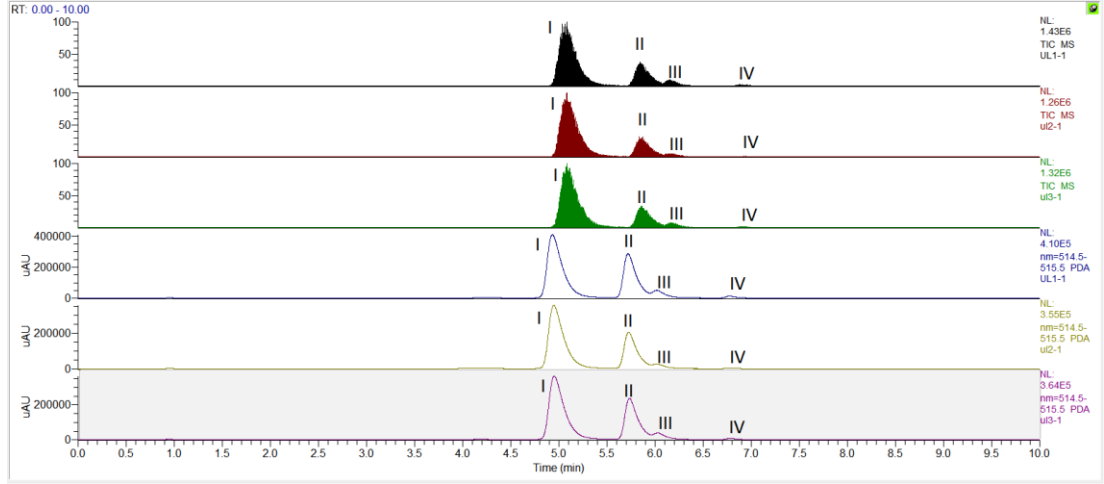
Ekstraksiyon tekrarlanabilirliği

Ekstraksiyon tekrarlanabilirliği çalışmasına yönelik üç paralel ekstraksiyona ait sonuçlar Kromatogram 25, Kromatogram 26 ve Tablo 34 ile gösterilmiştir.



Kromatogram 25. Orbital çalkalayıcı ile üç paralel ekstraksiyona ait MS ve DAD kromatogramları

I: siyanidin-3-glikozit, II: siyanidin-3-rutinozid
III: pelargonidin-3-glikozit IV: pelargonidin-3-rutinozid



Kromatogram 26. Ultrasonik banyo ile üç paralel ekstraksiyona ait MS ve DAD kromatogramları

I: siyanidin-3-glikozit, II: siyanidin-3-rutinozid
 III: pelargonidin-3-glikozit IV: pelargonidin-3-rutinozid

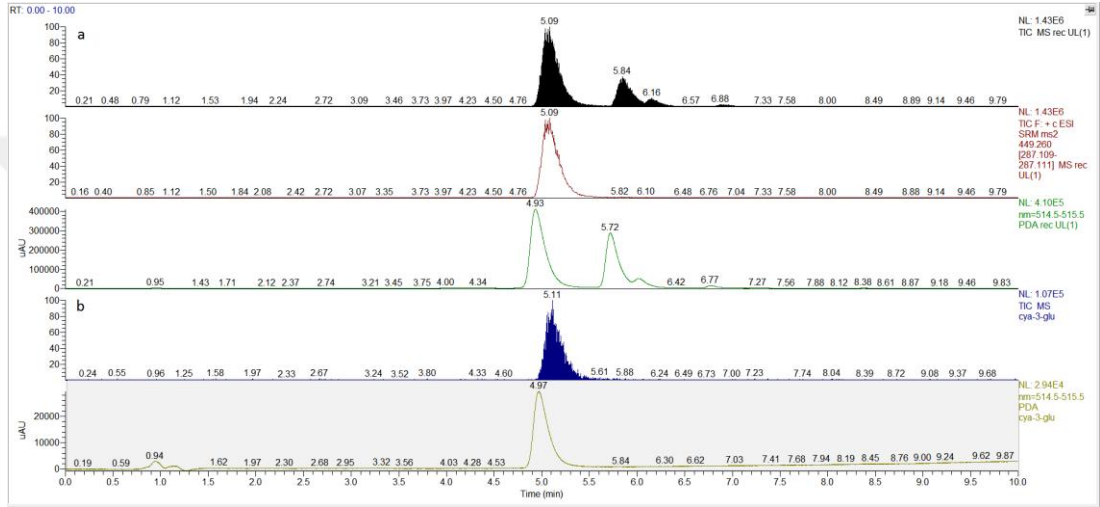
Tablo 34. Ekstraksiyon tekrarlanabilirliği validasyonu sonuçları

70:29:1 etanol:su:TFA Orbital çalkalayıcı ekstraksiyonu	Ekstraksiyon tekrarlanabilirliği					
	Ekstr e 1	Ekstr e 2	Ekstr e 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre	14,20	10,93	6,97	10,70	3,62	33,81
Siyanidin-3-glikozit miktarı mg/g ekstre	8,95	6,89	4,26	6,70	2,35	35,07
70:29:1 etanol:su:TFA Ultrasonik banyo ekstraksiyonu	Ekstr e 1	Ekstr e 2	Ekstr e 3	Ortalama mg/g	Standart Sapma	% RSD
Toplam antosiyanin miktarı mg siy-3-gliE/g ekstre	14,22	11,68	12,69	12,86	1,28	9,93
Siyanidin-3-glikozit miktarı mg/g ekstre	8,50	7,59	7,81	7,97	0,47	5,91

Geri kazanım

Ekstraksiyon geri kazanımına ait sonuçlar Kromatogram 27 ve Tablo 35 ile gösterilmiştir.

$$\text{Geri kazanım yüzdesi} = \frac{\text{standart ekilen drog ile ekstraksiyonda saptanan miktar}}{\text{ekilen miktar}} \times 100$$



Kromatogram 27. Geri kazanım validasyonu MS ve DAD kromatogramları

Tablo 35. Geri kazanım validasyonu sonuçları

LC-MS/MS analizi	Geri kazanım					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama $\mu\text{g/ml}$	Standart Sapma	% RSD
siyanidin-3-glikozit	1,64	1,66	1,67	1,64	0,02	0,95
	Ekilen $\mu\text{g/mL}$	Geri kazanım $\mu\text{g/mL}$		Geri kazanım yüzdesi		
siyanidin-3-glikozit	2	1,64		81,75		

Atılan kısımda madde miktar tayini

Ekstraksiyon sonrası drog içerisinde kalan hedef biyoaktif bileşenlerin tespitine yönelik sonuçlar

Tablo 36 ile sunulmuştur.

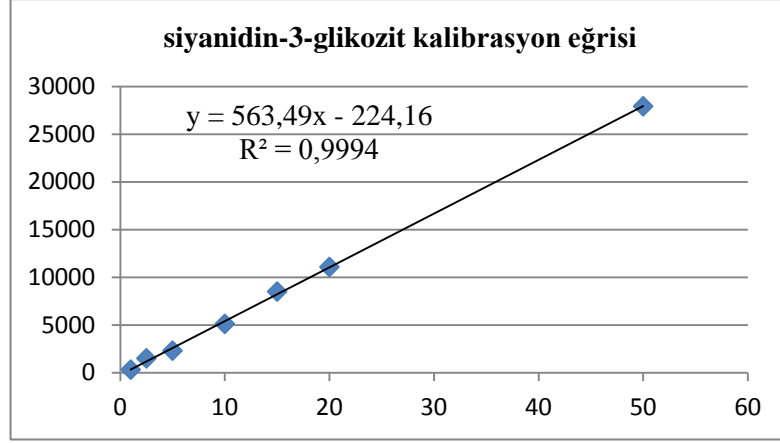
$$\text{Atılan kısımda kayıp yüzdesi} = \frac{\text{atılan kısımda miktar}}{\text{ekstredeki miktar} + \text{atılan kısımda miktar}} \times 100$$

Tablo 36. Ekstraksiyon sonrası atılan kısımda miktar tayini sonuçları

Atılan kısımda % kayıp miktarı			
Ekstraksiyon yöntemi	Toplam fenol miktarı GAE	Toplam flavonoit miktarı KE	Toplam antosiyanin miktarı siy-3-gliE
Orbital çalkalayıcı	% 8,83	% 12,38	% 8,02
Ultrasonik banyo	% 0,65	% 0,52	% 0,31
Süperkritik karbondioksit	% 90,09	*	*
Subkritik su	% 7,82	% 11,54	% 14,20
Mikrodalga destekli	% 1,71	% 2,31	% 1,59

Siyanidin-3-glikozit kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS antosiyanin miktar tayinine yönelik olarak yedi konsantrasyon noktası ile üç tekrarlı olarak siyanidin-3-glikozit kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Şekil 17 ve sonuçlar Tablo 37 ile sunulmuştur.



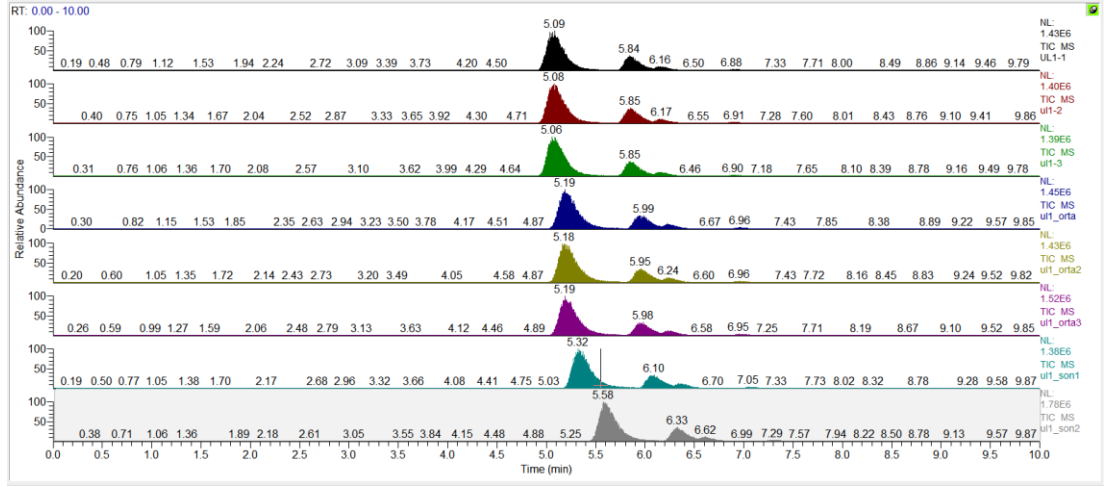
Şekil 17. Siyanidin-3-glikozit kalibrasyon eğrisi

Tablo 37. Siyanidin-3-glikozit kalibrasyon eğrisi sonuçları

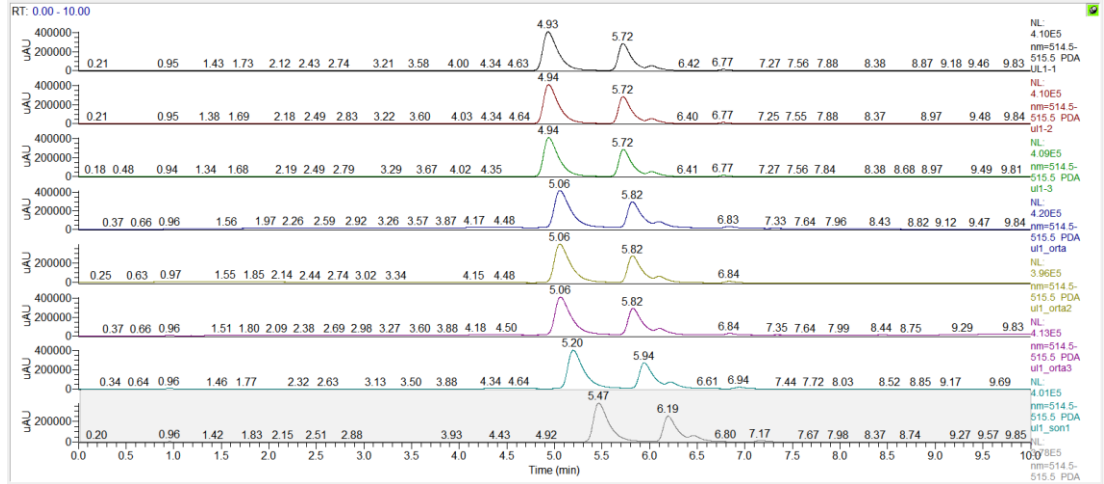
Siyanidin-3-glikozit	LC-MS/MS Kalibrasyon eğrisi					
	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama Alan	Standart Sapma	% RSD
1 ppm	319	314	319	317	2,89	0,91
2,5 ppm	1515	1479	1520	1505	22,39	1,49
5 ppm	2306	2310	2304	2307	3,06	0,13
10 ppm	5098	5118	5130	5115	16,17	0,32
15 ppm	8499	8543	8463	8502	40,15	0,47
20 ppm	11051	11067	11120	11079	36,12	0,33
50 ppm	28003	27860	27918	27927	71,92	0,26

Analiz tekrarlanabilirliği

Analiz tekrarlanabilirliği çalışmasına yönelik olarak aynı ekstrenin on ardışık analizine ait sonuçlar Kromatogram 28, Kromatogram 29 ve Tablo 38 ile gösterilmiştir.



Kromatogram 28. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği çalışması MS kromatogramları



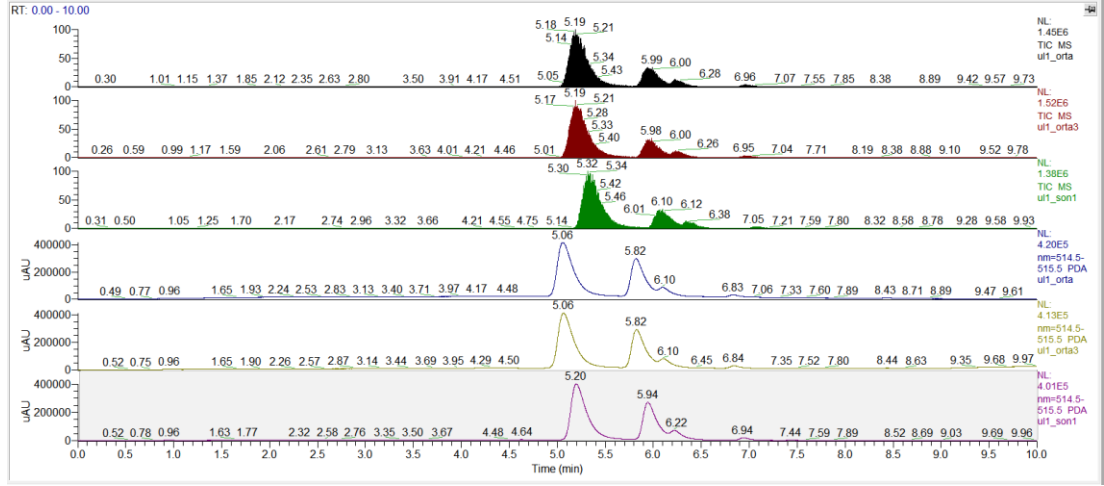
Kromatogram 29. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği çalışması DAD kromatogramları

Tablo 38. Analiz tekrarlanabilirliği sonuçları

LC-MS/MS Analizi	Enjeksiyon tekrarlanabilirliği		
	Alıkonma zamanı siyanidin-3-glikozit	Alan siyanidin-3- glikozit	Alan Toplam antosiyanin
Analiz 1	4,93	4377	7683
Analiz 2	4,94	4383	7626
Analiz 3	5,06	4386	7579
Analiz 4	5,06	4566	7892
Analiz 5	5,06	4525	7831
Analiz 6	5,20	4541	7830
Analiz 7	5,47	4478	7695
Analiz 8	5,41	4475	7731
Analiz 9	5,42	4481	7718
Analiz 10	5,43	4408	7596
Ortalama alan	5,20	4462	7718
Standart sapma	0,22	70	106
%RSD	4,14	1,57	1,37

Gün içi stabilite

Aynı analiz gününün başında, ortasında ve sonunda olmak üzere aynı ekstrenin analizini içeren gün içi stabilite çalışması sonuçları Kromatogram 30 ve Tablo 39 tablo ile gösterilmiştir.



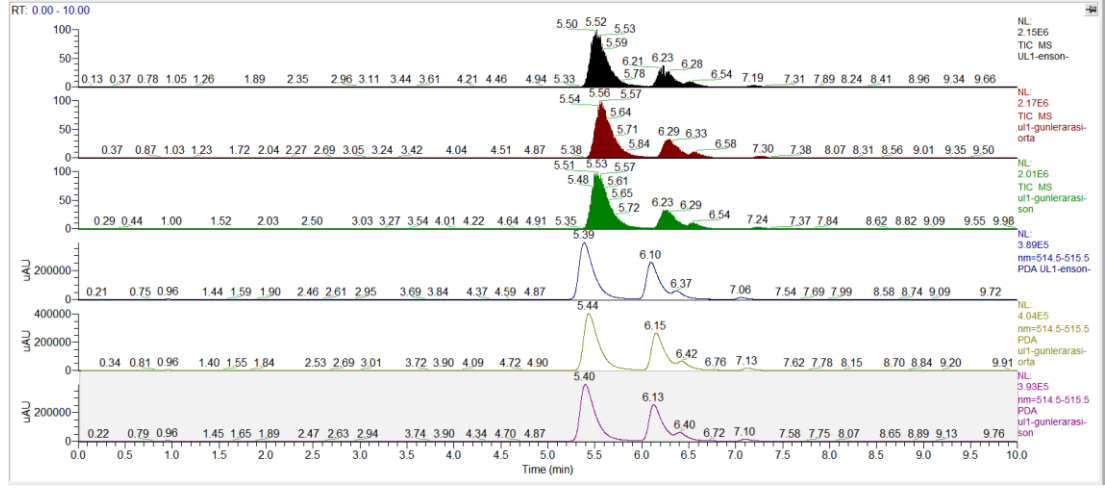
Kromatogram 30. Güncü stabilite validasyonu MS ve DAD kromatogramları

Tablo 39. Gün içi stabilite sonuçları

LC-MS/MS Analizi	Gün içi stabilite		
	Alıkonma zamanı siyanidin-3-glikozit	Alan siyanidin-3- glikozit	Alan Toplam antosiyanin
Gün başlangıcı	5,06	4382	7629
Gün ortası	5,06	4544	7851
Gün sonu	5,20	4478	7715
Ortalama alan	5,11	4468	7732
Standart sapma	0,08	81,46	111,81
%RSD	1,58	1,82	1,45

Günler arası stabilite

Ardışık üç analiz gününde aynı ekstrenin analizini içeren günlerarası stabilite çalışması sonuçları Kromatogram 31 ve Tablo 40 ile sunulmuştur



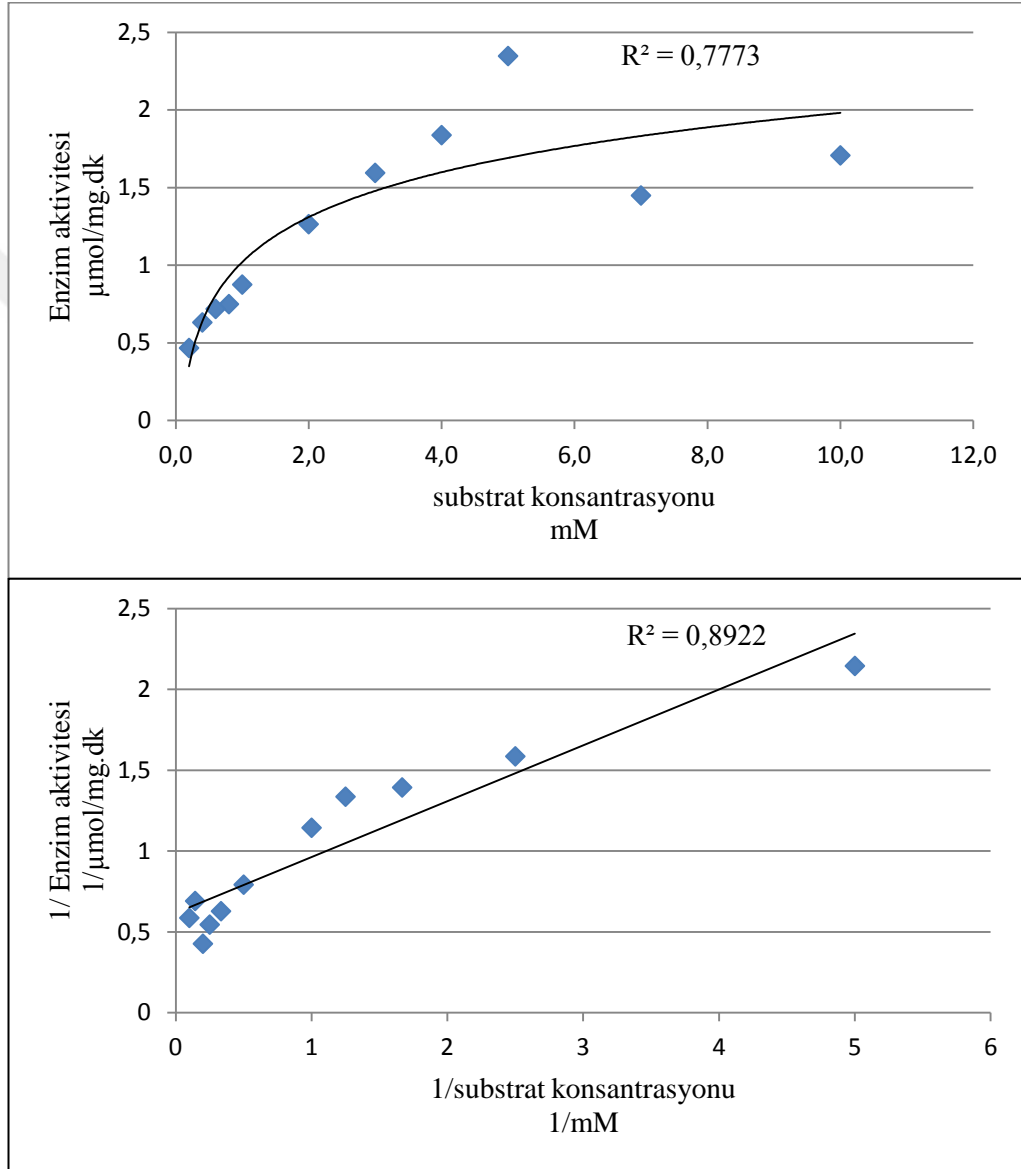
Kromatogram 31. Günler arası stabilite validasyonu MS ve DAD kromatogramları

Tablo 40. Günler arası stabilite sonuçları

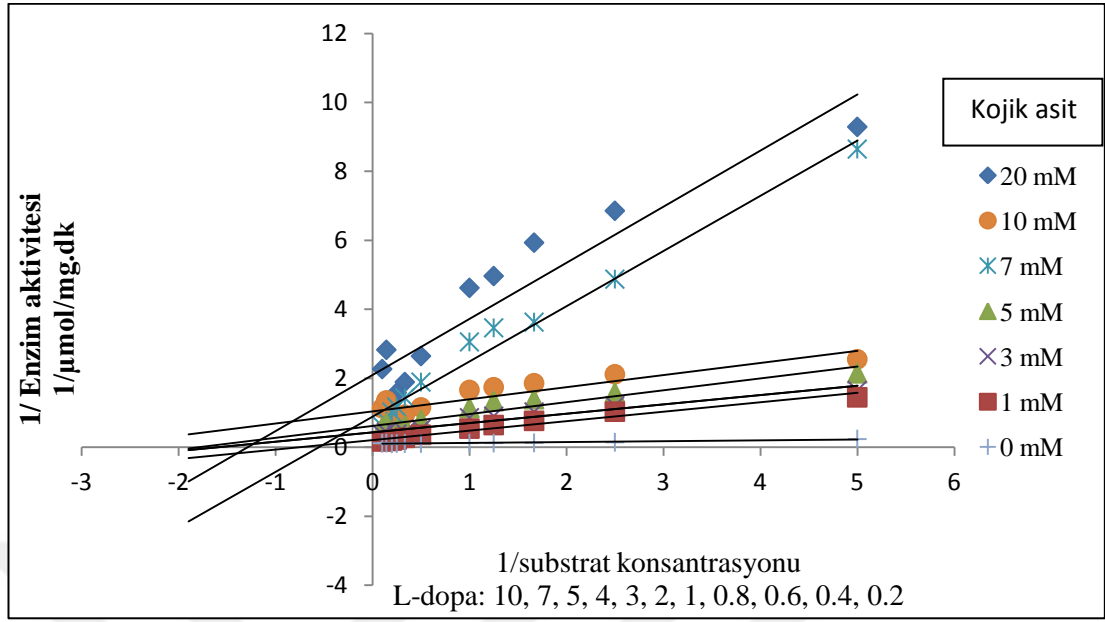
LC-MS/MS Analizi	Günler arası stabilite		
	Alıkonma zamanı siyanidin-3-glikozit	Alan siyanidin-3- glikozit	Alan Toplam antosiyanin
Gün 1	5,39	4382	7629
Gün 2	5,44	4408	7596
Gün 3	5,40	4393	7551
Ortalama alan	5,41	4394	7592
Standart sapma	0,03	13,07	39,49
%RSD	0,49	0,30	0,52

4.3. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Çalışmalarına ait Bulgular

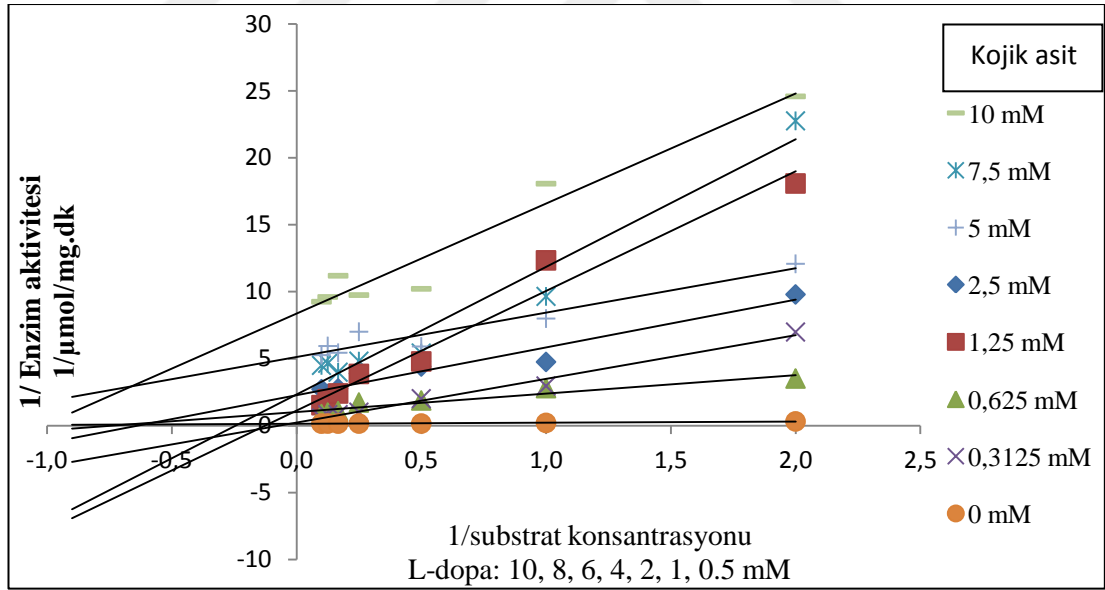
Tirozinaz inhibitör aktivite çalışmasına yönelik olarak literatürde yer alan protokol 1 (70), protokol 2 (71) ve protokol 3 (72) kullanılarak yapılan çalışmalara ait sonuçlar Şekil 18, Şekil 19, Şekil 20 ve Şekil 21 ile sunulmuştur.



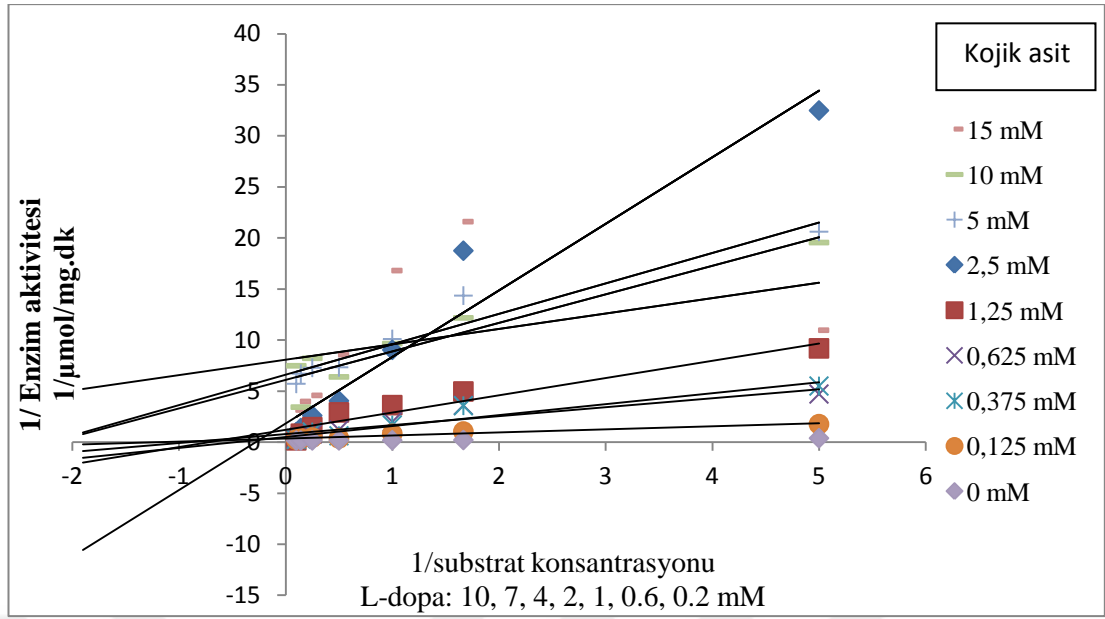
Şekil 18. Protokol 1 ile gerçekleştirilen tirozinaz inhibitör aktivite çalışması sonuçları



Şekil 19. Protokol 1 ile Lineweaver-Burk grafiği



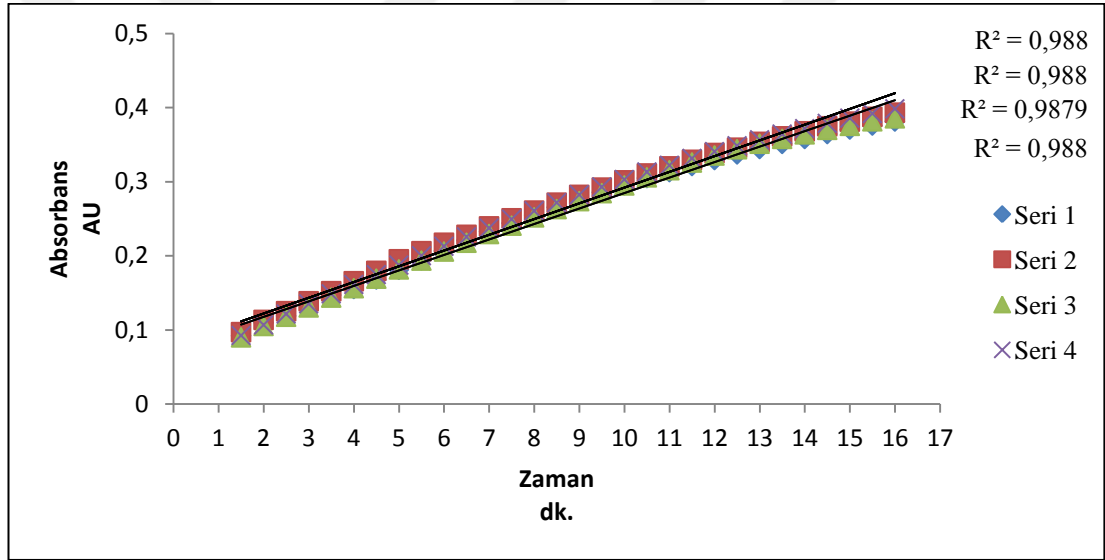
Şekil 20. Protokol 2 ile Lineweaver-Burk grafiği



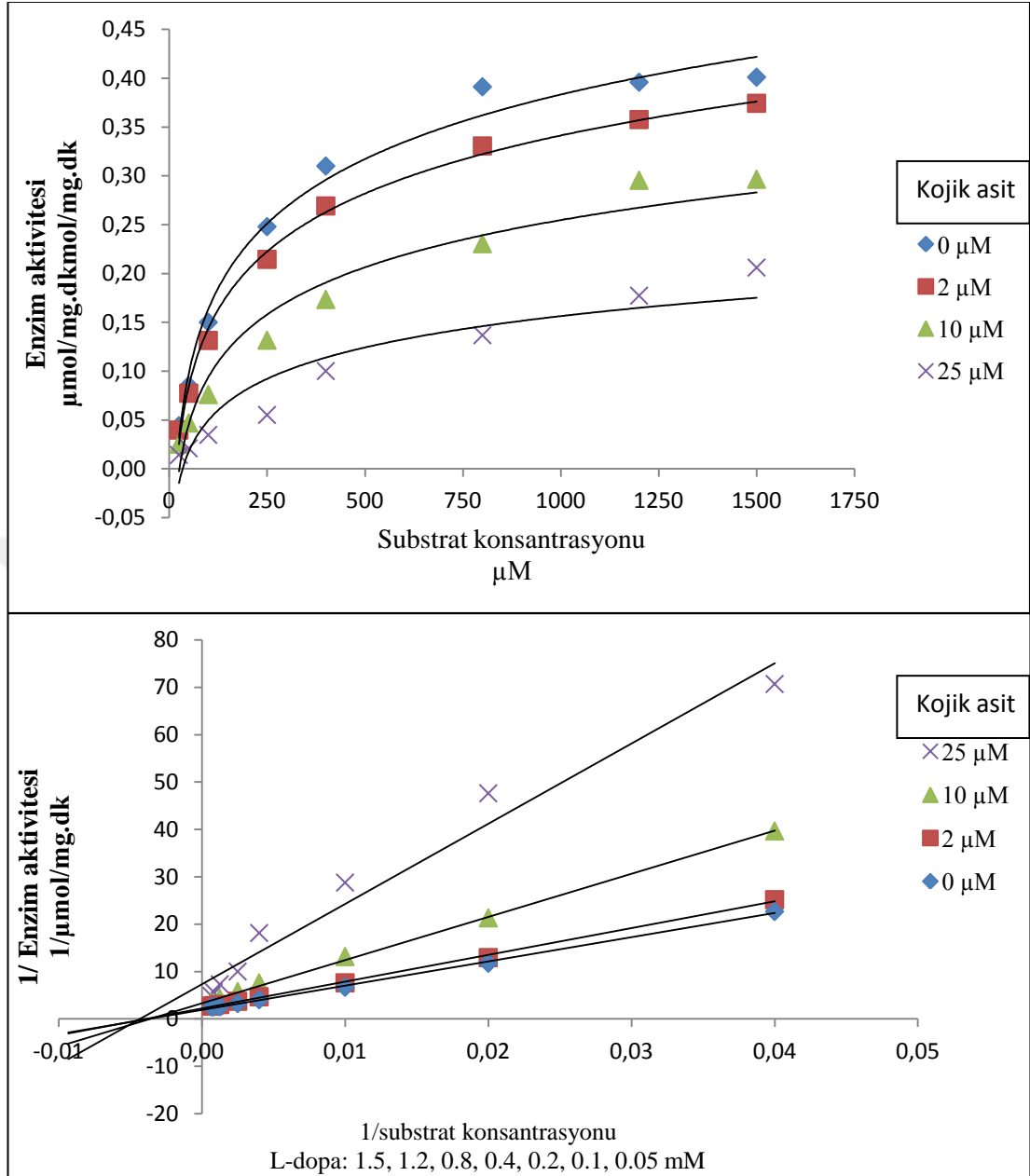
Şekil 21. Protokol 3 ile Lineweaver-Burk grafiği

4.3.1. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Protokolünün Oluşturulması

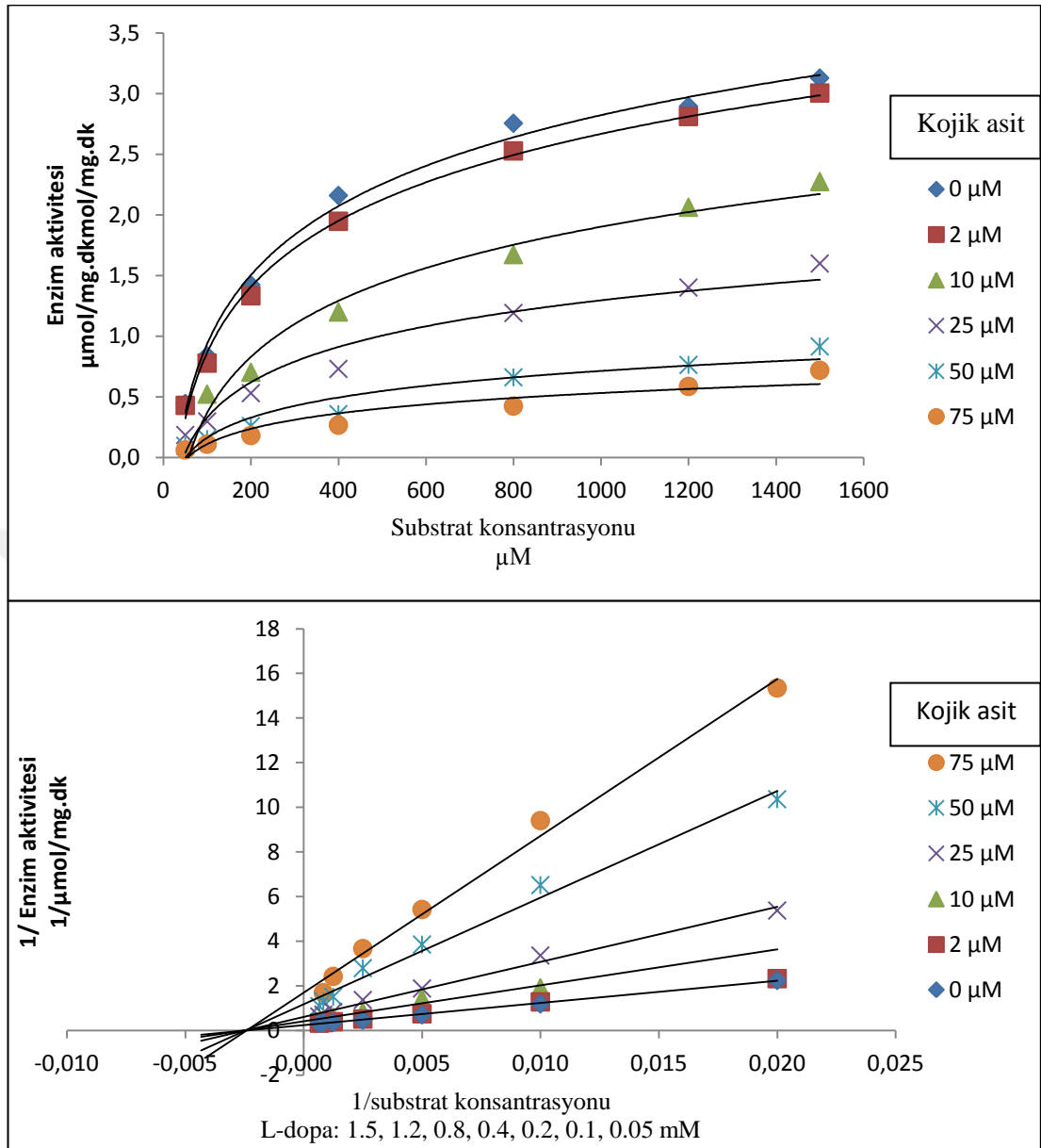
Literatürde yer alan farklı aktivite protokolleri kullanılarak yapılan çalışmalarda literatür sonuçları ve kendi sistemi içerisinde uyumsuz ve tutarlı olmayan sonuçlar alınması üzerine uygun substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, toplam inkübasyon süresi ve reaksiyon ortamında DMSO miktarı sınırını belirlemek amacıyla kinetik okuma modunda analizler yaparak aktivite protokolü geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalar neticesinde ekstrelerin tirozinaz inhibitör aktivitelerinin araştırılmasında kullanılacak protokol oluşturulmuştur. Sonuçlara ait grafikler Şekil 22, Şekil 23, Şekil 24, Şekil 25 ve Tablo 41 ile gösterilmiştir.



Şekil 22. Tirozinaz aracılığı ile L-dopa'nın zamana bağlı olarak dopakroma dönüşümü



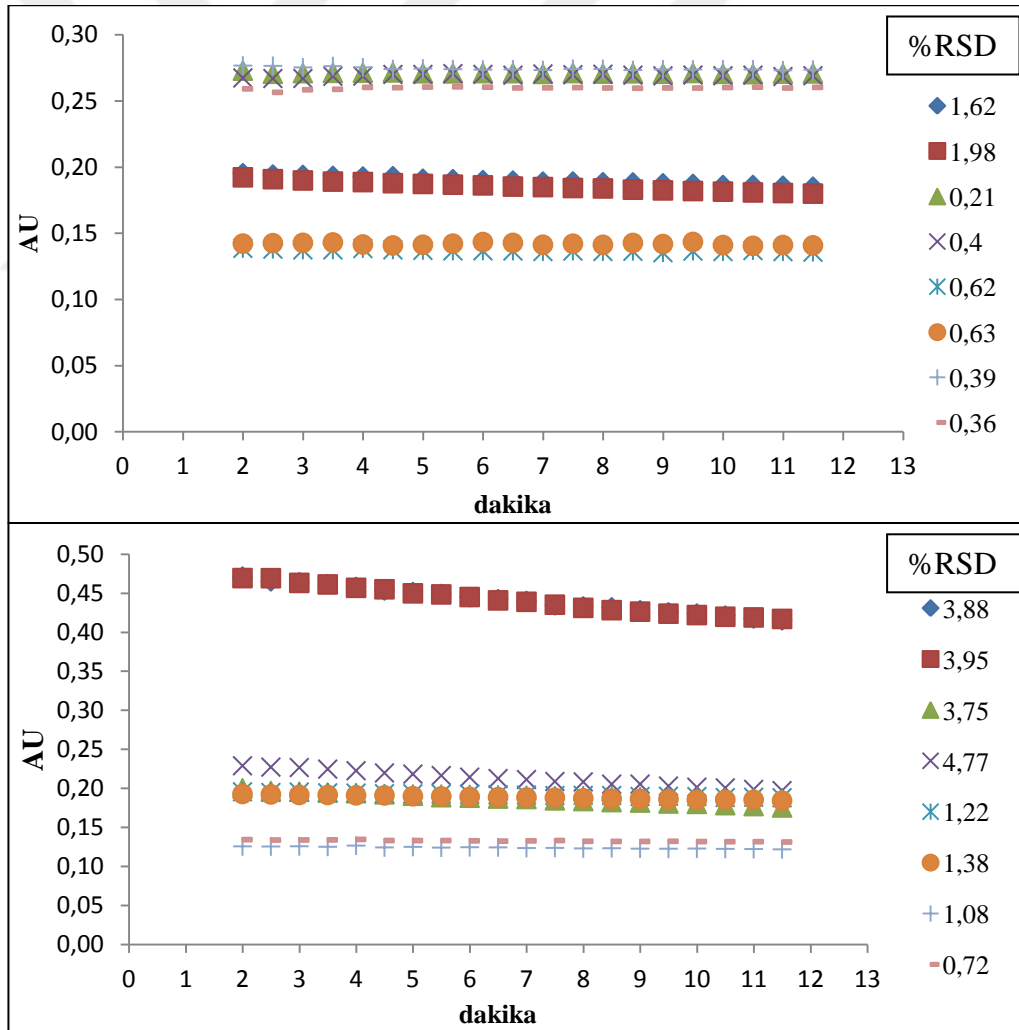
Şekil 23. 200 Unit/mL tirozinaz ile L-dopa'nın farklı konsantrasyonlarında kojik asit inhibisyonu



Şekil 24. 50 Unit/mL tirozinaz ile L-dopa'nın farklı konsantrasyonlarında kojik asit inhibisyonu

Tablo 41. Tirozinaz inhibisyon reaksiyon ortamında DMSO miktarı sınırı

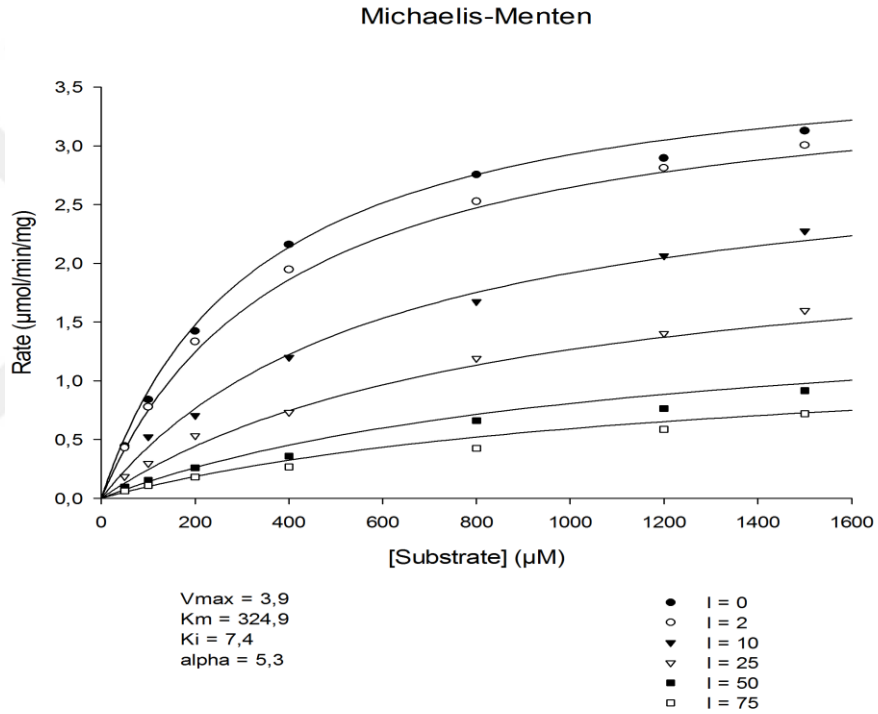
Tirozinaz inhibisyon reaksiyonu için ekstre hazırlama (25 µl çözücü)		Reaksiyon ortamındaki DMSO miktarı		Tirozinaz inhibisyon % fark				
DMSO	Fosfat tamponu	%	µl	Set 1	Set 2	Ortalama	Standard sapma	%RSD
4	1	10	20	19,28	18,52	18,90	0,54	2,85
3	2	7,5	15	12,24	13,66	12,95	1,00	7,71
1	1	6,25	12,5	10,73	11,07	10,90	0,24	2,21
2	3	5	10	3,77	4,34	4,05	0,40	9,83



Şekil 25. Substrat bulunmayan ortamda tirozinaz ile ekstrelerin etkileşimi

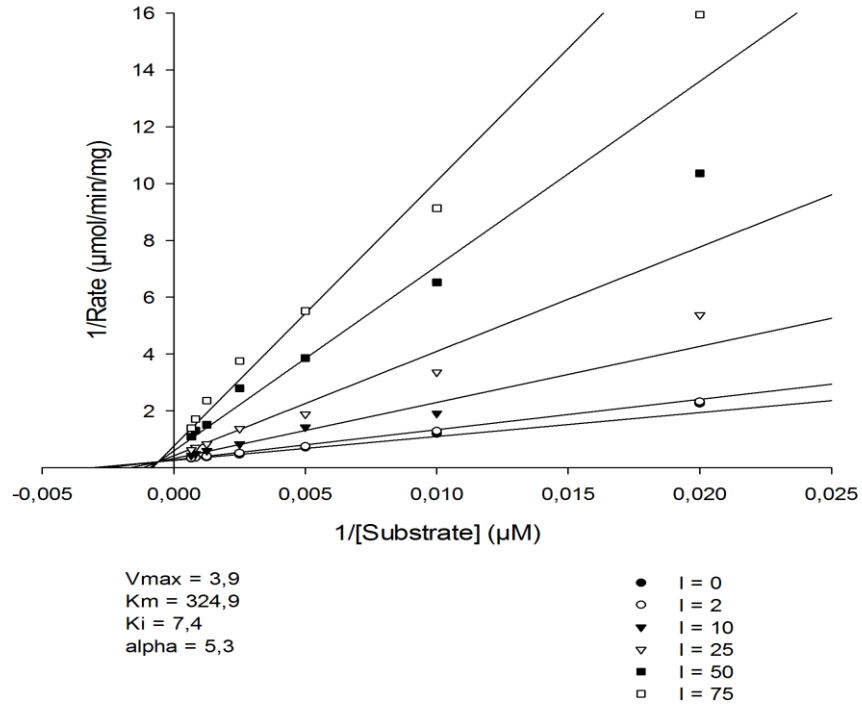
4.3.2. Enzim İnhibisyon Kinetik Çalışmaları Bulguları

Oluşturulan aktivite protokolü kullanılarak tirozinaz inhibitör aktivite çalışmalarında standart inhibitör ajan olarak yer alan kojik asit ve substrat olarak yer alan L-dopa ile enzim inhibisyon kinetiklerini gösteren Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Sigma Plot 12.0 Enzyme Kinetics Module 1.3 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Sonuçlar Şekil 26, Şekil 27 ve Tablo 42, Tablo 43 ile sunulmuştur.



Şekil 26. Oluşturulan tirozinaz inhibitör aktivite çalışma protokolü ile Michaelis-Menten grafiği (Sigma Plot 12.0 Enzyme Kinetics Module 1.3)

Lineweaver-Burk



Şekil 27. Oluşturulan tirozinaz inhibitör aktivite çalışma protokolü ile Lineweaver-Burk grafiği (Sigma Plot 12.0 Enzyme Kinetics Module 1.3)

Tablo 42. Kojik asidin tirozinaz inhibisyon tipini gösteren sonuçlar

Rank by	AICc	Equation	R ²	AICc	Sy.x	Test	Runs	Convergence
1		Mixed (Full)	0,99515	-213,131	6,783e-2		pass	Yes
2		Mixed (Partial)	0,99515	-210,373	6,877e-2		pass	Yes
3		Competitive (Full)	0,99068	-188,988	0,09275		pass	Yes
4		Competitive (Partial)	0,99068	-186,385	9,399e-2		pass	Yes
5		Noncompetitive (Full)	0,98895	-182,016	0,10098		pass	Yes
6		Noncompetitive (Partial)	0,98895	-179,413	0,10234		pass	Yes
7		Uncompetitive (Full)	0,96007	-129,341	0,19196		pass	Yes
8		Uncompetitive (Partial)	0,96007	-126,738	0,19454	pass	pass	Yes

Parameters

	Value	±Std. Error	95% Conf. Interval
Vmax	3,8738	7,801e-2	3,7157 to 4,0318
Km	324,9086	20,5175	283,3353 to 366,4819
Ki	7,4028	0,8667	5,6468 to 9,1589
alpha	5,2613	1,4502	2,3228 to 8,1998

Goodness of Fit

Degrees of Freedom	37
AICc	-213,131
R ²	0,995
Sum of Squares	0,170
Sy.x	6,783e-2
Runs Test p Value	0,500

Tablo 43. Kojik asit IC₅₀ değeri

Kojik asit					IC ₅₀	
μM	% inhibisyon				μM	μg/mL
	ortalama	standard sapma	%RSD	R ²		
75	77,00	0,26	0,34	0,9806	29,30	4,10
50	70,75	0,22	0,30			
25	48,89	0,80	1,63			
10	27,18	2,67	9,82			
2	3,95	0,46	11,69			

4.3.3. Ekstrelerin Tirozinaz İnhibitör Aktiviteleri

Ekstrelerin tirozinaz inhibitör aktiviteleri oluşturulan aktivite protokolü kullanılarak mikropalak okuyucu ile 10 dk inkübasyon süresi boyunca 30 sn. aralıklı kinetik okumalar alınarak enzim aktivitesinin lineer olduğu başlangıç hızları üzerinden hesaplanmıştır.

Konvansiyonel ekstraksiyon sistemleri ile elde edilen ekstrele ait aktivite sonuçları Tablo 44, süperkritik CO₂ ekstrelerine ait aktivite sonuçları Tablo 45, Tablo 46 ve Tablo 47, subkritik su ekstrelerine ait aktivite sonuçları Tablo 48,

Tablo 49, Tablo 50, mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstrele ait aktivite sonuçları Tablo 51, Tablo 52, Tablo 53 ve optimum koşullarda ekstre edilen diğer droglara ait sonuçlar Tablo 54, Tablo 55 ile sunulmuştur.

Tablo 44. Konvansiyonel çözücü ekstraktleri tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları

Konvansiyonel çözücü ekstraksiyonları	Tirozinaz inhibitör aktivite IC ₅₀			
	Ortalama mg/mL	Standard sapma	%RSD	R ²
Orbital çalkalayıcı ekstresi etanol:su:TFA (70:29:1)	2,81	0,16	5,69	0,9794
Ultrasonik banyo ekstresi etanol:su:TFA (70:29:1)	2,69	0,05	1,84	0,9862
Ultrasonik banyo ekstresi su % 100	1,77	0,11	6,22	0,9718
(Aseton:su 70:30) – kloroform (1:2) partiyonu	4,06	0,25	6,27	0,9756

Tablo 45. Süperkritik CO₂ ekstraksiyon optimizasyonu tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları

Run	Block	Factor 1 A:Temperature C	Factor 2 B:Pressure bar	Factor 3 C:Co-solvent %	Response 1 Tyrosinase inhibiton IC50
1	Block 1	40.00	120.00	5.00	1373
2	Block 1	40.00	160.00	2.00	1750
3	Block 1	60.00	200.00	8.00	344
4	Block 1	80.00	120.00	2.00	1420
5	Block 1	40.00	160.00	8.00	828
6	Block 1	60.00	160.00	5.00	857
7	Block 1	40.00	200.00	5.00	1057

Tablo 46. Süperkritik CO₂ ekstraktlerinin tirozinaz inhibitör aktiviteleri

Süperkritik CO ₂ ekstraktleri			Tirozinaz inhibitör aktivite IC ₅₀			
Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Co-solvan (%)	Ortalama mg/mL	Standard sapma	%RSD	R ²
60	200	8	0,342	0,023	6,62	0,9893
40	160	8	0,828	0,089	10,76	0,9825
60	160	5	0,857	0,129	15,02	0,9594

Tablo 47. Optimum süperkritik CO₂ ekstresinde etkiden sorumlu fraksiyonun aktivite sonuçları

Optimum süperkritik CO ₂ ekstresinin (60 °C, 200 bar, %8 co-solvan) aktif fraksiyonu (hekzan:etilasetat, 85:15)					IC ₅₀
µg/mL	% tirozinaz inhibisyon				
	ortalama	standard sapma	%RSD	R ²	
31,250	69	1,54	2,23	0,9665	10,69
15,625	58	0,75	1,29		
12,500	52	0,01	0,03		
9,375	47	0,77	1,64		
3,125	42	0,36	0,86		

Tablo 48. Subkritik su ekstraksiyon optimizasyonu tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları

Run	Block	Factor 1 A:temperature C	Factor 2 B:time min	Factor 3 C:flow rate ml/dk	Response 1 total phenol	Response 2 total flavonoid	Response 3 total anthocyanin	Response 4 LC-MS anthocyanin	Response 5 Tyrosinase inhib %
1	Block 1	60.00	60.00	2.00	28.65	2.59	7.73	9.45	65
2	Block 1	80.00	60.00	4.00	22.94	3.10	1.21	0.52	45
3	Block 1	40.00	60.00	4.00	19.83	1.83	4.38	3.55	52
4	Block 1	60.00	20.00	6.00	19.64	1.99	2.57	1.96	37
5	Block 1	60.00	40.00	4.00	24.13	2.38	5.83	6.53	56
6	Block 1	80.00	40.00	2.00	27.26	2.59	4.98	4.90	57
7	Block 1	80.00	20.00	4.00	24.97	2.29	5.82	6.32	60
8	Block 1	60.00	40.00	4.00	22.75	2.39	3.93	5.64	56
9	Block 1	60.00	40.00	4.00	21.56	2.21	4.20	3.42	50
10	Block 1	80.00	40.00	6.00	26.51	2.98	2.23	0.96	51
11	Block 1	40.00	40.00	2.00	17.26	1.47	3.26	3.53	43
12	Block 1	40.00	40.00	6.00	17.02	1.49	3.44	3.74	40
13	Block 1	60.00	20.00	2.00	21.66	1.79	2.88	2.70	40
14	Block 1	40.00	20.00	4.00	16.54	1.51	3.64	3.87	51
15	Block 1	60.00	60.00	6.00	18.61	1.92	4.60	3.69	52

Tablo 49. Subkritik su ekstralarının tirozinaz inhibitör aktiviteleri

Subkritik su ekstraları			Tirozinaz inhibitör aktivite IC ₅₀			
Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Akış hızı (ml/dk)	Ortalama mg/mL	Standard sapma	%RSD	R ²
60	60	2	1,84	0,02	1,59	0,9956
80	60	4	2,85	0,02	0,70	0,9981
100	60	2	1,48	0,01	0,91	0,9902
120	60	2	1,71	0,11	6,43	0,9973

Tablo 50. Optimum subkritik su ekstrasında etkidenden sorumlu fraksiyona ait tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları

Optimum subkritik su ekstrasının (60 °C, 60 dk, 2 mL/dk) aktif fraksiyonu (su:metanol, 60:40)					IC ₅₀
µg/mL	% tirozinaz inhibisyon				µg/mL
	ortalama	standard sapma	%RSD	R ²	
125,00	62	1,46	2,39	0,9766	86,75
93,75	57	0,63	1,12		
62,50	40	1,47	3,77		
31,25	29	0,61	2,14		
15,625	21	1,94	9,25		

Tablo 51. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları

Run	Block	Factor 1 A:power watt	Factor 2 B:ethanol conc %	Factor 3 C:time min	Response 1 total phenol	Response 2 total flavonoid	Response 3 total anthocyanin	Response 4 LC-MS anthocyanin	Response 5 Tyrosinase Inh
1	Block 1	500.00	35.00	10.00	23.88	2.25	10.02	11.92	74
2	Block 1	500.00	70.00	5.00	23.83	2.37	10.06	12.1	64
3	Block 1	700.00	35.00	15.00	23.34	2.58	9.32	8.41	60
4	Block 1	500.00	35.00	10.00	24.67	2.35	10.62	12.63	80
5	Block 1	300.00	70.00	10.00	24.91	2.66	10.87	12.73	70
6	Block 1	500.00	0.00	5.00	24.11	2.67	9.74	11.77	58
7	Block 1	700.00	35.00	5.00	24.49	2.42	9.32	11.7	76
8	Block 1	300.00	35.00	15.00	24.5	2.43	9.6	11.71	68
9	Block 1	500.00	35.00	10.00	25.35	2.46	9.93	12.33	78
10	Block 1	500.00	70.00	15.00	24.47	2.6	9.26	10.48	63
11	Block 1	300.00	35.00	5.00	25.01	2.53	9.68	10.75	61
12	Block 1	700.00	70.00	10.00	24.43	2.7	8.9	9.99	61
13	Block 1	500.00	0.00	15.00	21.05	2.63	8.82	9.99	60
14	Block 1	700.00	0.00	10.00	22.92	2.83	9.71	11.76	61
15	Block 1	300.00	0.00	10.00	22.19	2.59	7.53	8.16	55

Tablo 52. Mikrodalga ekstraktlarının tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları

Mikrodalga ekstraktları				Tirozinaz inhibitör aktivite IC ₅₀			
Güç (watt)	Etanol miktarı (%)	Süre (dk)	Drog:çözücü oranı	Ortalama mg/mL	Standard sapma	%RSD	R ²
500	35	10	1:50	1,63	0,13	7,98	0,9313
300	70	10	1:50	1,67	0,12	7,19	0,9749
700	0	10	1:50	2,25	0,02	0,89	0,9539
300	70	15	1:50	1,78	0,01	0,56	0,9643
500	35	10	1:10	1,44	0,05	3,47	0,9868
300	70	15	1:10	1,52	0,02	1,34	0,9676

Tablo 53. Optimum mikrodalga ekstresinde etkidenden sorumlu fraksiyona ait tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları

Optimum mikrodalga ekstresinin (300 watt, %70 etanol, 10 dk) aktif fraksiyonu (su:metanol, 60:40)				IC ₅₀	
µg/mL	% tirozinaz inhibisyon			R ²	µg/mL
	ortalama	standard sapma	%RSD		
187,50	53	3,54	6,67	0,9577	166,50
125,00	41	2,83	6,90		
93,75	39	4,24	10,88		
62,50	26	4,24	16,32		
31,25	19	0,71	3,72		

Tablo 54. Optimum ekstraksiyon sistemlerinde *Raphanus sativus* ‘Red Meat’ ekstrelerinin tirozinaz inhibitör aktivitesi

<i>Raphanus sativus</i> ‘Red Meat’						
Optimize subkritik su ekstresi			Tirozinaz inhibitör aktivite IC ₅₀			
Sıcaklık (°C)	Akış hızı (ml/dk)	Süre (dk)	Ortalama mg/mL	Standard sapma	%RSD	R ²
60	2	60	4,14	0,13	2,98	0,9807
Optimize mikrodalga ekstresi			Tirozinaz inhibitör aktivite IC ₅₀			
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Ortalama mg/mL	Standard sapma	%RSD	R ²
300	70	10	1,95	0,27	13,89	0,9446

Tablo 55. Optimum ekstraksiyon sistemlerinde *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* ekstrelerinin tirozinaz inhibitör aktivitesi

<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>						
Optimize subkritik su ekstresi			Tirozinaz inhibitör aktivite IC ₅₀			
Sıcaklık (°C)	Akış hızı (ml/dk)	Süre (dk)	Ortalama mg/mL	Standard sapma	%RSD	R ²
60	2	60	2,82	0,16	5,67	0,9423
Optimize mikrodalga ekstresi			Tirozinaz inhibitör aktivite IC ₅₀			
Güç (watt)	Etanol oranı (%)	Süre (dk)	Ortalama mg/mL	Standard sapma	%RSD	R ²
300	70	10	1,26	0,06	4,76	0,9643

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Morus nigra meyvelerinin ileri ekstraksiyon teknikleri olarak tanımlanan süperkritik CO₂, subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri ile tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca optimizasyonu sağlanmıştır.

Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar

Morus nigra L. meyve ve yaprak kısımlarında morfolojik ve anatomik karakterlerin tespitine yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular Türkiye Flora'sında *Morus nigra* deskripsiyonu ile uyum içerisinde olarak bulunmuştur (16). Ayrıca Türkiye'de Isparta yöresinde ve Pakistan'da Himalayalar'da yetişen *Morus nigra*'dan alınan yaprak örnekleri üzerinde yürütülen iki ayrı çalışmada da bulgularımıza benzer şekilde sonuçlar elde edilmiştir (73, 74). Ovat şekilli, tabanı derin kalpsi yapraklar basit ve 3-loblu tipte olabilmektedir. Yaprak üst yüzeyinde kalkansı tip salgı tüyleri ile düz ve kancalı tip örtü tüyleri, yaprak alt yüzeyinde sık şekilde düz ve kancalı tip örtü tüyleri tespit edilmiştir. *Morus nigra*'nın diğer *Morus* türlerinden ayırımına yönelik Türkiye Florası'nda yer alan yaprak üst yüzeyinin pürüzlü (kısa sert tüylü: scabrous) ve alt yüzeyinin yumuşak tüylü (pubescent) olması durumu literatür çalışmalarınca da belirtilmiştir. Literatür bulgularına ilave olarak, yaptığımız incelemelerde yaprak üst yüzeyinde lamina tüysüz iken damarların scabrous düz ve kancalı tüyler ile kaplı olduğu, yaprak alt yüzeyinde ise laminanın pubescent düz ve kancalı tüyler ile kaplı iken damarların scabrous düz ve kancalı tüyler ile kaplı olduğu belirlenmiştir. On üç farklı *Morus* türü üzerinde yürütülen bir çalışmada ise sadece yaprak alt yüzeyinde damarların seyrek yumuşak tüylü olduğu belirtilmiştir (75). Yaprak yüzeylerinde değişen tüylülük dağılımı farklı ekolojik koşullar ve genetik özellikler ile ilişkili olabileceği gibi doğallaşmış türler olarak kabul gören *Morus* cinsinin kültürü sebebiyle hibritleşme sonucu ortaya çıkmış özellikler de olabileceği düşünülmektedir. Bu özelliğin, yapılacak kapsamlı çalışmalar ile *Morus* türlerinin ayırımında Türkiye Florası'nda yer alan karakterlere ilave olarak kullanılabilme durumu aydınlatılabilecektir. Türkiye'de 43 farklı lokasyondan *Morus nigra*, *Morus alba* ve *Morus rubra* örneklerinin toplanarak yürütülen moleküler karakterizasyon çalışmasında Kahramanmaraş, Adana ve Tokat civarında yetişen *Morus alba* türünde

mor renk meyveye sahip genotiplerin bulunduğu tespit edilmiştir (76). Benzer şekilde Girit'te *Morus alba* ve *Morus nigra* türleri üzerinde yürütülen bir çalışmada da *Morus alba*'nın beyaz (Aspri), mor (Rodini) ve siyah (Mavri) renkte meyvelere sahip varyeteleri bulunduğu belirtilmiştir (77). Bu veriler ışığında *Morus* türlerinin ayırımında yalnızca meyve örneklerinin kullanımının doğru sonuçlar vermeyebileceği düşünülebilir. Türkiye Florası'nda belirtilen tüm karakterlerin incelenerek tür ayırımının yapılması *Morus* tür tayininde doğru sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır. Floramızda doğal yayılışı bulunmayıp 400 yılı aşkın süredir kültürünün yapıldığı kaydedilen ve doğallaşmış olarak tanımlanan *Morus* türlerinin farklı kısımları ile yürütülecek morfolojik ve anatomik çalışmalar ile henüz kaydedilmiş türler arası benzerlik ve farklılıkların detaylı şekilde ortaya konması sağlanabilecektir.

Araştırma Materyalinin Hazırlanması

Uygulanan farklı ekstraksiyon yöntemlerinde laboratuvar çalışmaları boyunca eşdeğer kompozisyona sahip *Morus nigra* meyveleri ile çalışılabilmesi amacıyla meyvelerin suyu uzaklaştırılarak homojen bir drog kümesi oluşturulmuştur. Yüksek su içeriği sebebiyle *Morus nigra* meyvelerinin kurutulmasında kurutma kabinleri fayda sağlayamamıştır. Etüv ile 60°C'de 3 gün boyunca yapılan kurutma işlemleri sonucunda %23,60 kuru ağırlığa ulaşılabilmiş ancak etüvde taze meyveler mevcut bulunan sularını bırakmışlardır; dolayısıyla suda çözünen aktif bileşenlerin kaybı riski ortaya çıkmıştır. Bu nedenle *Morus nigra* meyvelerinin kurutulmasında liyofilizasyon yöntemi kullanılmıştır. Laboratuvara taşınma sonrasında -80°C'de 24 saat bekletilen taze meyveler -60 °C'de 8 gün süren liyofilizasyon işlemi sonrasında ortalama %20,12 kuru ağırlığa ulaşmıştır. Literatürde de *Morus nigra* meyveleri ile yapılmış çalışmalarda, ekstraksiyon işlemi öncesinde meyvelerin kurutulması amacıyla liyofilizasyon yöntemine başvurulduğu belirlenmiştir (30, 39, 41, 64, 78). Antosiyaninlerin eldesine yönelik ekstraksiyon ile analiz ve aktivite çalışmalarını kapsayan bir araştırmada taze drog ile liyofilize drog (*Vaccinium myrtillus*) arasında antosiyanin miktarı açısından değişim bulunmazken etüvde kurutulan örnek içeriğinde bulunan antosiyaninlerde bozulma olduğu tespit edilmiş ayrıca DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivitede %62 düşüş olduğu kaydedilmiştir (79). Antosiyanince zengin ekstre eldesinin hedeflendiği bu tez çalışmasında üç ayrı liyofilizasyon serisi içerisinde altı farklı örnek seti sonucunda elde edilen %18,95, %20,76 ve %20,65 kurutma değerleri ile %5,06 bağıl standart sapma sonucunda

Morus nigra meyvelerinin kurutulmasında liyofilizasyon yönteminin homojen bir drog kümesi oluşturma açısından uygun ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Spektrofotometrik Analiz Çalışmaları

Ekstrelerin içerisinde bulunan temel biyoaktif bileşen grupları birçok farklı çalışmada kullanıldığı üzere spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Toplam fenol miktar tayini amacıyla Folin-Ciocalteu, toplam flavonoit miktar tayini amacıyla alüminyum klorür metodu ve toplam antosiyanin miktar tayini amacıyla pH değişim yönteminden faydalanılmıştır.

Spektrofotometrik olarak toplam fenol miktar tayini amacıyla kullanılan Folin-Ciocalteu yöntemi, sekonder metabolit guplarından fenolik yapıda bileşikler dışında farklı moleküllerin de reaksiyona girişimde bulunması sebebiyle eleştiri almaktadır (80, 81). Toplam fenol miktarı yerine toplam indirgen/antioksidan kapasite şeklinde ifadesinin daha doğru olabileceği şeklinde değerlendirmeler bulunmaktadır (82). Buna karşın özellikle ekstraksiyon optimizasyonu çalışmalarında optimizasyon cevabına yönelik olarak kantitatif sonuçlar sunması ve hızlı uygulanabilir, ekonomik, tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem oluşu ile çalışmamızda fayda sağlamış, aktivite sonuçları ile kompozisyon ilişkisinin ortaya konmasında katkıda bulunmuştur. Toplam fenol miktar tayini sonuçları sadece fenolik bileşen miktarı olarak ifade etmek yerine farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstrelerin sahip olduğu kompozisyonları karşılaştırabilmek adına kullanılan kantitatif veriler olarak değerlendirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında da toplam fenol miktar tayini analizleri bu yönden yararlı olmuştur. Toplam flavonoit miktar tayininde kullanılan alüminyum klorür metodu ile toplam antosiyanin miktar tayininde kullanılan pH değişim metodu ise daha yüksek seçiciliğe sahip yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Özellikle pH değişim metodunda antosiyaninlerin 520 nm’de maksimum absorbans vermesinden yararlanılmaktadır. Flavonoit grubu altında yer alan flavonlar 260 nm, flavanol, flavanon ve proantosiyanidinler 278 nm ve flavonoller 370 nm’de maksimum absorbans vermektedir (83). Aynı örnek içerisinde bulunan farklı yapıdaki flavonoitlerin yüksek hassasiyet ile analizi maksimum absorbans verdikleri değerler kullanılarak sağlanabilmiştir (84). YBSK analizleri açısından da 520 nm okumalarda tespit edilen piklerin antosiyanin analizi açısından seçici olduğu ve piklerin toplamının toplam antosiyanin miktarı olarak ifade

edilebileceği bildirilmiştir (63). Spektrofotometrik ve YBSK ile belirlenen toplam antosiyanin miktarları arasında da önemli bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (85). Toplam fenol miktar tayini sonuçları gallik asit eşdeğeri ve toplam flavonoit miktar tayini sonuçları kersetin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. 25-250 µg/mL konsantrasyon aralığında altı noktalı üç tekrarlı olarak oluşturulan gallik asit kalibrasyon eğrisinin R² değeri 0,9989 ve 10-100 µg/mL konsantrasyon aralığında yedi noktalı üç tekrarlı olarak oluşturulan kersetin kalibrasyon eğrisi R² değeri 0,9999 olarak belirlenmiştir. Üç tekrarlı olarak çalışılan toplam fenol ve flavonoit miktar tayini analizleri yüksek doğrusalık ile gerçekleştirilebilmiştir.

LC-MS/MS Analiz Çalışmaları

LC-MS/MS ile antosiyanin miktar tayini sonuçları siyanidin-3-glikozit eşdeğeri olarak belirtilmiştir. Analizlerde kullanılacak YBSK yönteminin belirlenmesi amacıyla literatürde yer alan metotlar ile çalışılmıştır. Toplam 17 dk analiz süresine sahip metot 1 (69) ile siyanidin-3-glikozit standardının analizi başarılı olmamıştır. Keskin ve kuyuksuz bir pik ile doğrusal bir temel çizgi elde edilememiştir. Metot 1 ile başarılı sonuç alınamaması üzerine literatürde yer alan diğer yöntemler denenmiştir. Toplam 38 dk analiz süresine sahip metot 2 (49) ve 16 dk'lık metot 3 (5) ile siyanidin-3-glikozit standardı ve *Morus nigra* meyve ekstresi analiz edilmiştir. Metot 2 ile yapılan analizlerde düzgün bir temel çizgi elde edilebilmiş, 2,10 dk alıkonma zamanında siyanidin-3-glikozit standardı DAD ve MS dedektör ile okunmuştur. *Morus nigra* meyve ekstresi analizinde de DAD dedektörde 2,26 dk da tek keskin pik halinde belirlenmiştir. Ancak bu pikin MS dedektör okuması sonucunda dört ana antosiyanin olarak siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit sinyallerini içerdiği tespit edilmiştir. Metot 2 (49) ile siyanidin-3-glikozit standardı ve *Morus nigra* meyve ekstresi analizi keskin ve kuyuksuz tek pik okuması ile başarılı gibi görünse de aslında dört ana antosiyanin molekülünün ayrımı sağlanamadığı için DAD dedektörde tek bir pik şeklinde belirlenmektedir. Aynı zamanda bu durum antosiyaninlerin YBSK analizlerinde MS dedektör ile çalışmanın önemini göstermiştir. Metot 2 ile dört ana antosiyanin molekülünün analizi sağlanamadığı için literatürde yer alan metot 3 (5) ile denemeler yapılmıştır. Metot 3 ile analizlerde de metot 2'deki gibi düzgün bir temel çizgi ile siyanidin-3-glikozit standardı ve *Morus nigra* meyve ekstresi analizlerinde 4,88 dk'da keskin ve kuyuksuz tek pik tespit

edilmiştir; MS dedektör analizinde ise bu pikin dört antosiyanin sinyalini de içerdiği belirlenmiştir. Metot 2 ve 3 ile siyanidin-3-glikozit standardının analizi başarılımış ancak ekstre içerisinde bulunan farklı yapıdaki antosiyaninlerin ayrımı sağlanamamıştır. Her 3 metodu kullanarak 50 x 2.1mm, 1.7 µm ve 100 x 2.1mm, 3 µm UPLC kolonları ile çalışmalar yürütülmesine rağmen başarılı olunamamıştır. Siyanidin-3-glikozit ile beraber diğer tüm ana antosiyanin piklerinin analizinin sağlanabilmesi amacıyla analiz metodu geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Metot geliştirme aşamasında Thermo Scientific Aplikasyon Not 281'den yola çıkılmış ve çalışmalar sonucunda analiz süresinin 10 dk olduğu dört ana antosiyanin pikinin de DAD dedektör ile keskin ve kuyuksuz olarak ayrımının sağlanarak piklerin MS dedektör ile de doğrulandığı özgün bir analiz metodu geliştirilmiştir. YBSK ile antosiyanin analizinde kritik noktanın mobil fazın %10 formik asit içeriği ile yüksek asiditeye sahip olması ve antosiyanin piklerinin belirlendiği alıkonma zamanı bölgesinde gradient elüsyonda keskin bir değişim oluşturarak tüm piklerin üstüste gelmeden ayrımının sağlanabilmesi olduğu belirlenmiştir. 50 x 2.1 mm, 1.7 µm kolon ile 100 x 2.1mm, 3 µm kolona kıyasla keskin ayırım sağlanabilmesinden dolayı ekstre analizlerinde 50 x 2.1 mm, 1.7 µm kolon kullanılmıştır. Her iki kolonda literatürde yer alan analiz metotları ile yürütülen denemelerde 30 °C kolon fırın sıcaklığında 200 µl/dk akış hızı analizlerinde başarılı olunmuştur. LC-MS/MS ile antosiyanin miktar tayinlerinde kullanılan bir yöntem olarak ekstrelerin toplam antosiyanin miktarları, siyanidin-3-glikozit eşdeğeri olarak belirlenmiştir (63, 66, 67). Siyanidin-3-glikozit standardı ile 1-50 µg/mL konsantrasyon aralığında 7 noktalı 3 tekrarlı olarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (R^2 : 0,9994). Üç tekrarlı analizler sonucunda 515 nm DAD ve SRM modunda MS dedektör ile tespit edilen siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-glikozit miktarlarının toplamı LC-MS/MS toplam antosiyanin miktarı olarak ifade edilmiştir. LC-MS/MS analiz validasyonu çalışmaları kapsamında doğrusalılık, tekrarlanabilirlik, gün içi stabilite ve günler arası stabilite çalışmaları yürütülmüştür. 1-50 µg/mL aralığında yedi farklı konsantrasyonda siyanidin-3-glikozit kalibrasyon eğrisinde R^2 değeri 0,9994 olarak tespit edilmiştir. Aynı ekstre örneğinin siyanidin-3-glikozit miktarına yönelik on ardışık analizinde bağıl standard sapma değeri %1,37 olarak belirlenmiştir. Analiz gününün başında, ortasında ve sonunda olmak üzere aynı ekstretenin sahip olduğu siyanidin-3-glikozit miktarına yönelik analizleri içeren gün içi stabilite çalışmasında bağıl standard sapma değeri %1,45 ve ardışık üç analiz

gününde aynı ekstrenin sahip olduğu siyanidin-3-glikozit miktarına yönelik analizleri içeren günler arası stabilite çalışmasında bağıl standard sapma değeri %0,52 olarak belirlenmiştir. Analiz validasyonu çalışması sonuçları uyarınca LC-MS/MS analiz metodu açısından yöntem geçerliliğinin sağlanmış olduğu söylenebilmektedir.

Tirozinaz İnhibitör Aktivite Protokolü Geliştirme Çalışmaları

Farklı çalışmalarda yer alan tirozinaz inhibitör aktivite çalışmalarına ait sonuçların aktivite protokolü kaynaklı sorunlar nedeniyle kıyaslanamadığı belirtilmektedir (3). Tez çalışmasında literatürde yer alan tirozinaz inhibitör aktivite protokolleri ile yürütülen denemelerde tutarlı ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Substrat olarak L-dopa ve standart inhibitör ilaç olarak kojik asit ile literatürde yer alan her üç aktivite protokolü ile de literatür verileri ile uyuşan enzim inhibisyon kinetik sonuçlarına ulaşılamamıştır. Bu sebepten ötürü ekstrelerin tirozinaz inhibitör aktivitelerinin araştırılmasında kullanılacak aktivite protokolünün geliştirilmesi amacıyla reaksiyonda yer alacak uygun substrat, inhibitör ve enzim miktarları, doğru inkübasyon süresi, reaksiyon ortamında DMSO sınırı ve reaksiyon izlem tipi (end-point ya da kinetik okuma) belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda geliştirilen tirozinaz inhibitör aktivite protokolü ile Sigma Plot Enzyme Kinetics Module 1.3 kullanılarak oluşturulan Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri ile kojik asidin enzim inhibisyon tipi (mixed inhibition) literatür verileri ile aynı bulunmuştur. Aktivite protokolü ile doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlayan en temel noktanın, reaksiyon hızının lineer olduğu yüksek başlangıç hızları ile belirli bir inkübasyon süresi aralığında kinetik okumalar alınarak enzim inhibisyonun takip edilmesi olduğu değerlendirilmiştir. Literatürde enzim kinetiği çalışmalarında reaksiyon hızının lineer olduğu başlangıç hızları ile çalışılmasının doğru sonuçlar sağlayacağı belirtilmiştir (86). Özellikle literatürde yer alan aktivite protokollerinde end-point okumalar yapılarak enzim inhibisyon yüzdelerinin hesaplanması ve değişen inhibitör konsantrasyonlarında IC₅₀ değerlerini tespit etmeksizin sadece tek konsantrasyonda elde edilen yüzde inhibisyon karşılaştırmaları ile verilerin sunulması güvenilir sonuçlara ulaşılmasına engel olmaktadır. Örneğin kojik asit konsantrasyonu artsa da belirli konsantrasyon üzerinde tirozinaz inhibisyon değeri %95 olarak kalmaktadır. IC₅₀ değeri tespit edilmeksizin kojik asit ile yapılacak karşılaştırmalarda, kojik asidin %95 inhibisyon sağladığı nokta doğru şekilde belirtilemeyecek ve araştırma materyalinin tirozinaz inhibitör aktivite potansiyelinin

değerlendirmesi sağlıklı yapılamayacaktır. Doğru inkübasyon süresi ile çalışılmaması durumunda ise enzim aktivitesinin kendiliğinden azalmaya başladığı noktaların hesaba katılması yine yanlış sonuçların eldesine sebep olabilmektedir. Tirozinaz inhibitör aktivite sonuçlarının güvenilirliği üzerine tartışmalar literatürde de konu edilmiş ve dopakrom oluşum reaksiyonuna etki eden her ajana hatalı şekilde inhibitör ifadesi kullanıldığı belirtilmiştir (3, 87). Tez çalışmasında standart tirozinaz inhibitör ilaç olan kojik asidin inhibisyon kinetik verileri ışığında geliştirilen aktivite protokolü kullanılarak, kinetik okumalar ile enzim hızının lineer olduğu reaksiyon başlangıç hızları üzerinden ekstrelerin değişen konsanstrasyonlarındaki aktivitesi ile IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları sunulmuştur.

Konvansiyonel Çözücü Ekstraksiyonu Çalışmaları

Konvansiyonel ekstraksiyon çalışmalarında çözücü ekstraksiyonunda kullanılan temel sistemler olan orbital çalkalayıcı (63) ve ultrasonik banyo (64) ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Antosiyaninlerin eldesine yönelik çözücü ekstraksiyonlarında kullanılan çözücü sistemleri etanol/metanol, su ve asit karışımlarından oluşmaktadır (30, 34, 44, 88, 89). *Morus nigra* meyvelerinden antosiyanince zengin ekstre eldesinde çözücü karışımlarının etkisinin araştırıldığı çalışmada en etkili bulunan sistem metanol ve su karışımlarının asitlendirildiği çözücü karışımlarıdır (7, 64). Metanolün toksisitesinden dolayı farmasötik ürüne yönelik çalışmalarda etanol tercih edilmesi sebebiyle tez çalışmasında da etanol kullanılmıştır. Antosiyaninleri aktif formları olan flavilyum katyonu olarak stabil halde tutmak için ise asidik çözeltiler ile ekstraksiyonun yapılması gerektiği belirtilmiştir (54, 90). Ancak ekstraksiyon çözücüsünde kullanılan asidin türü kaynama derece farklılıklarından dolayı önem taşımaktadır. Yüksek kaynama derecesine sahip asitler ile çalışılması ekstraksiyon işlemi sonrasında evaporatörde alkol su karışımları uzaklaştırılır iken ekstre bileşenlerinin yüksek oranda aside maruz kalmasına ve dolayısıyla bozulmalarına sebep olmaktadır (54, 90). Hidroklorik asit 110 °C, formik asit 100 °C ve trifloroasetik asit 72 °C kaynama noktasına sahiptir. Tez çalışmasında konvansiyonel ekstraksiyon çalışmalarında kullanılacak asidin türünün belirlenmesi amacıyla *Morus nigra* meyveleri ile 70:29:1 etanol:su:asit çözücü sistemi kullanılarak yapılan ön çalışmalarda hidroklorik asit kullanımında (pH:1,08) liyofilize drogda 3,36 mg/g, formik asit kullanımında (pH:2,75) liyofilize drogda 6,90 mg/g ve taze drogda 6,61 mg/g, trifloroasetik asit

kullanımında (pH:1,44) liyofilize drogda 9,44 mg/g ve taze drogda 8,66 mg/g siyanidin-3-glikozit eşdeğeri toplam antosiyanin miktarı elde edilmiştir. Ön çalışma sonuçları ışığında çözücü sistemlerinde asit olarak trifloroasetik asit kullanılmıştır.

Üç paralel olarak gerçekleştirilen konvansiyonel çözücü ekstraksiyonlarında orbital çalkalayıcı ile elde edilen ekstrelerde bağıl standard sapma değeri siyanidin-3-glikozit bakımından %35,07 ve toplam antosiyanin miktarı bakımından %33,81 olarak bulunmuştur. Kabul edilebilir sınırların üzerinde bulunan bağıl standart sapma değerleri ile orbital çalkalayıcı ekstraksiyonunun tekrarlanabilir bir yöntem olmadığı tespit edilmiştir. Orbital çalkalayıcı ile tek yönlü oluşan dairesel hareketler sonucunda droğun dış tarafında kalan kısımların çözücü ile devamlı teması sağlanırken iç kısımların temasının kısıtlı kalması bu duruma sebep olarak düşünülebilir. Ultrasonik banyoda ses dalgaları sayesinde kavitasyon etkisi ile hücre duvarı yapısında bozulma ve geçirgenlikte artış sağlandığı bildirilmiştir (91). Ultrasonik banyo ile elde edilen ekstrelerde ise bağıl standard sapma değeri siyanidin-3-glikozit bakımından %5,91 ve toplam antosiyanin miktarı bakımından %9,93 olarak bulunmuştur; ultrasonik banyo ekstraksiyonunda tekrarlanabilirlik sağlanabilmiştir. Ultrasonik banyo ekstrelerinde spektrofotometrik olarak belirlenen toplam fenol (19,51 mg GAE/g ekstre), flavonoit (3,51 mg KE/g ekstre) ve antosiyanin miktarı (11,54 mg siy-3-gliE/g ekstre) ile LC-MS/MS toplam antosiyanin miktarı (12,69 mg siy-3-gliE/g ekstre) değerleri orbital çalkalayıcı ekstrelerinde tespit edilen toplam fenol (17,21 mg GAE/g ekstre), toplam flavonoit (2,08 mg KE/g ekstre), toplam antosiyanin (9,87 mg siy-3-gliE/g ekstre) ve LC-MS/MS antosiyanin miktarına (10,93 mg siy-3-gliE/g ekstre) üstün gelmiştir. Ultrasonik banyo ekstraksiyonunun orbital çalkalayıcı ekstraksiyonuna kıyasla tekrarlanabilirliği daha yüksek bir yöntem olmanın yanında biyoaktif bileşenler bakımından daha zengin ekstreler sağladığı belirlenmiştir. Literatürde antosiyaninlerin eldesine yönelik olarak uygulanan aseton-su:kloroform partisyonu (92, 93) ile elde edilen ekstrede toplam antosiyanin miktarı ise 6,47 mg siy-3-gliE/g ekstre olarak tespit edilmiştir. Ultrasonik banyo ile %100 su ve 99:1 su:TFA ekstraksiyonlarında ise 5,30 mg/g ve 6,24 mg siy-3-gliE/g ekstre toplam antosiyanin miktarları elde edilmiştir. Konvansiyonel ekstraksiyonlar açısından ultrasonik banyoda etanol:su:TFA 70:29:1 çözücü sisteminin ile kullanımı antosiyanince zengin ekstre eldesine yönelik olarak başarılı bulunmuştur. Konvansiyonel çözücü ekstrelerinin tirozinaz inhibitör aktivite çalışmaları sonucunda elde edilen IC₅₀

değerleri ise aseton-su:kloroform partisiyonu için 4,06 mg/mL, ultrasonik banyo %100 su ekstresi için 1,71 mg/mL, ultrasonik banyo etanol:su:TFA 70:29:1 ekstresi için 2,69 mg/mL ve orbital çalkalayıcı etanol:su:TFA 70:29:1 ekstresi için 2,81 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Daha yüksek antosiyanin miktarlarına ulaşılan ekstraktların tirozinaz inhibitör aktiviteleri daha yüksek bulunmuştur. Ultrasonik banyo %100 su ekstresinde ise diğer çözücü sistemlere kıyasla daha düşük antosiyanin miktarlarına ulaşılmasına karşın daha yüksek tirozinaz inhibitör aktivite tespit edilmiştir. Antosiyaninler dışında da birçok fenolik asit ve flavonoid gibi fenolik yapıdaki bileşiklerin tirozinaz inhibitör aktiviteye sahip olduğu literatürde bildirilmiştir (94-96). Ultrasonik banyo ekstraksiyonunda %100 su ekstresi için toplam fenol miktarı 34,49 mg GAE/g kuru ekstre ve toplam flavonoid miktarı 3,19 mg KE/g kuru ekstre, etanol:su:TFA 70:29:1 ekstresinde ise toplam fenol miktarı 19,51 mg GAE/g kuru ekstre ve toplam flavonoid miktarı 3,51 mg KE/g kuru ekstre olarak bulunmuştur. Hedeflenen bileşenler olarak siyanidin ve pelargonidin türevleri dışında kalan ve %100 su ile ekstraksiyonu daha başarılı olan diğer fenolik yapıdaki bileşiklerin daha yüksek tirozinaz inhibitör aktiviteye (IC_{50} : 1,77 mg/mL) ulaşılmasını sağladığı değerlendirilebilir. Ekstraksiyon validasyonuna yönelik olarak orbital çalkalayıcı ve ultrasonik banyo ile kör ekstraksiyon (ekilen siyanidin-3-glikozit standardı dışında sinyal tespit edilmemiştir), ekstraksiyon tekrarlanabilirliği (toplam antosiyanin miktarı açısından orbital çalkalayıcı %RSD: 33,81 ve ultrasonik banyo %RSD: 9,93), ekstraksiyon geri kazanımı (ultrasonik banyo % geri kazanım: 81,75) çalışmaları yürütülmüştür. Ekstraksiyon sonrası atılan kısımda toplam antosiyanin miktarı tayininde orbital çalkalayıcıda %8,02, ultrasonik banyoda %0,31, subkritik su ekstraksiyonunda %14,20 ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda %1,59 kayıp saptanmıştır. Konvansiyonel metotlar ve ileri ekstraksiyon sistemlerinin tümünde kör ekstraksiyonlarda çözücü kaynaklı haricinde sinyal tespit edilmemiş; ekstraksiyonda kullanılan ekipmanlardan çözücüye geçiş olmadığı saptanmıştır. Subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda antosiyanin miktarları açısından tekrarlanabilirlik değerleri %22,09 ve %4,20 olarak tespit edilmiştir. Subkritik su sisteminde antosiyanin eldesi açısından tekrarlanabilirlik değerleri yüksek kalmış ancak toplam fenol (%5,63) ve toplam flavonoid (%4,34) açısından tekrarlanabilirlik sağlanmıştır. Bu sonuçlar uyarınca subkritik su ekstraksiyonunda sistem içi sıcaklık ve basınç değerleri kontrolünün bilgisayar otomasyonu olmadan manuel takibi sebebiyle, ekstraksiyon süresince parametrelerde oluşabilecek dalgalanmalardan antosiyaninlerin diğer

bileşen gruplarına göre daha fazla etkilendiği değerlendirilebilir. Drog içerisinde mevcut antosiyaninlerin tamamının tüketilerek çözücüye geçirilmesi açısından ultrasonik banyo en etkili yöntem olurken subkritik su ekstraksiyonu en zayıf yöntem olarak saptanmıştır. Ultrasonik banyo ekstraksiyonunun toplam 250 ml çözücü ile birer saatlik beş ardışık ekstraksiyon sonucunda en az aktif bileşen kaybını sağlamıştır. Subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyon ise konvansiyonel yöntemlere kıyasla 5 ve 30 kat daha kısa sürelerde daha seçici ekstraksiyon işlemi yapılabilmesine imkan vermiştir. Özellikle mikrodalga destekli ekstraksiyonda 12 kat daha düşük etanol kullanımı ile 10 dk'lık ekstraksiyondan kalan kısımda toplam antosiyanin miktarında sadece %1,59 kayıp olması ileri ekstraksiyon tekniklerinin avantajlarını göstermesi açısından önemli bir değerdir. Meyvelerde tespit edilen toplam antosiyanin miktarı orbital çalkalayıcı ekstresinde 2,04 mg siy-3-gliE/g taze meyve ve ultrasonik banyo ekstresinde 2,35 mg siy-3-gliE/g taze meyve olarak bulunmuştur. Bu değerler ile araştırma materyalinin temin edildiği İzmir civarındaki *Morus nigra* popülasyonunun meyvelerinde, başka çalışmalarda yer alan Amasya (0,83 mg/g taze meyve) (51) ve Çoruh Vadisindeki (0,79 mg/g taze meyve) (50) *Morus nigra* popülasyonlarının meyvelerinden daha yüksek oranda antosiyanin bulunduğu saptanmıştır. Tez çalışmasında yer alan araştırma materyalinin floramızdaki diğer yayılış gösterdiği bölgelere kıyasla daha zengin içeriğe sahip olduğu söylenebilir. Floramızda farklı bölgelerde yayılış gösteren *Morus nigra*'ya ait meyve örneklerinin standart ekstraksiyon metotları kullanılarak karşılaştırılması sonrasında en net sonuçlar ortaya konabilecektir.

İleri Ekstraksiyon Teknolojileri ile Çalışmalar

İleri ekstraksiyon sistemleri olarak, süperkritik akışkan teknolojisinin kullanıldığı süperkritik karbondioksit ve subkritik su ekstraksiyon sistemleri ile mikrodalga teknolojisinin kullanıldığı mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri kullanılmıştır. İleri ekstraksiyon teknolojilerinin kullanımında birçok farklı parametrenin biyoaktif bileşenlerin eldesi üzerinde etkili olması sebebiyle optimizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Yanıt yüzey metodolojisi Box-Benhken dizaynı kullanılarak optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Optimizasyon başarımının ölçütü olarak model ($p < 0,05$) ve model uygunsuzluğu (≤ 1) değerleri göz önüne alınmıştır. İleri ekstraksiyon sistemlerinin optimizasyon çalışmalarında tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca süperkritik karbondioksit

ekstraksiyonunda model değeri 0,0345, subkritik su ekstraksiyonunda model değeri 0,0173, model uygunsuzluğu 0,7504 ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda model değeri 0,0119, model uygunsuzluğu 0,7344 olarak tespit edilmiştir. İleri ekstraksiyon sistemleri ile tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca *Morus nigra* meyvelerinin ekstraksiyon optimizasyonu sağlanmıştır. Yalnızca süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda hedef bileşen grubu olan antosiyanince zengin ekstre eldesinde çalışma hedeflerinden çok düşük değerlerde kalınmasından ötürü deney deseni mevcut setler ile tamamlanmış, model uygunsuzluk değeri belirlenmemiştir. Elde edilen tirozinaz aktivite sonuçlarından yola çıkılarak tez çalışması sonrasında da süperkritik karbondioksit ekstrelerinde aktiviteden sorumlu bileşenlerin tespitine yönelik araştırmalara devam edilmesi ve bu bileşenlerin eldesine yönelik deney deseni oluşturularak optimizasyon çalışmalarına devam edilmesi planlanmıştır.

Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyon Optimizasyonu

Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon optimizasyonu 60 dk dinamik ekstraksiyon süresi ile 40-80 °C sıcaklık; 120-200 bar basınç ve %2-8 co-solvan etanol ilavesi yanıt yüzey metodolojisi Box-Benhken dizaynı kullanılarak tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca optimize edilmiştir. Hedef bileşen grubu olan antosiyaninlerin eldesi belirlenen parametreler dahilinde başarılı olamamıştır. Süperkritik karbondioksit sisteminin gerekli polariteye ulaşması bakımından %8 etanol ilavesinin yetersiz kaldığı söylenebilir. Antosiyanin eldesinin mümkün olabileceği koşulların tespiti amacıyla optimum sıcaklık (60 °C) ve basınç (200 bar) değerlerinde %40 gibi çok yüksek etanol ilavesi koşulunda dahi toplam antosiyanin miktarı 2,44 mg siy-3-gliE/g ekstre değerlerinde kalmıştır. Etanol miktarının %10 olarak ilavesi durumunda ise toplam antosiyanin miktarında ciddi oranda düşüş (0,92 mg siy-3-gliE/g ekstre) tespit edilmiştir. Bu oranda co-solvan ilavesi ile çalışılması durumunda da sistemin süperkritik akışkan ekstraksiyonu yerine zenginleştirilmiş akışkan ekstraksiyonu olarak ifade edilmesi daha doğru olabilir. Benzer şekilde antosiyanince zengin ekstre eldesine yönelik süperkritik karbondioksit çalışmalarında gerekli polariteyi sağlamakta düşük etanol ilavesinin yetersiz kalması sebebi ile co-solvan olarak suyun kullanımının gerekli olduğu belirtilmiştir (18, 67, 68, 85, 97). Süperkritik karbondioksit sistemlerinde ise co-solvan tipi kısıtlayıcı bir faktördür. Çalışılan sistemin tüm elemanlarının suyun sebep olduğu korozyona dayanıklı yapıda olması gerektiğinden tüm sistemlerde co-solvan olarak suyun kullanımı mümkün

olamamaktadır. Tez çalışmasında kullanılan sistem de co-solvan olarak su kullanımına izin vermediği için mevcut süperkritik karbondioksit ekstraksiyon ekipmanının imkan tanıdığı ölçüde sadece etanol kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür. Hedef biyoaktif bileşen grubu olarak antosiyanin eldesinin sınırlı kalması nedeniyle deney deseninde 7 ekstraksiyon serisi ile sadece tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca optimizasyon çalışması yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar ise araştırmaya yeni boyutlar getirecek nitelikte olmuştur. *Morus nigra* meyvelerinden elde edilen total ekstrelerin tirozinaz inhibitör aktiviteleri kıyaslandığında süperkritik karbondioksit ekstraktlarında kayda değer oranda aktivite tespit edilmiştir. 60 °C, 200 bar, %8 co-solvan ekstresinin IC₅₀ değeri 0,342 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Sadece basınç değerlerinde değişim aktivite cevabı üzerinde etkili olmazken, yükselen basınca eşlik eden artan sıcaklık değerleri ile elde edilen ekstraktlarda daha yüksek tirozinaz inhibitör aktivite saptanmıştır. Bu durum literatürde de bildirildiği şekilde artan sıcaklık ve basınç değerleri ile co-solvan olarak etanol ilavesinin biyoaktif bileşenlerin (özellikle polifenollerin) ekstraksiyonunda artış sağlanması olarak yorumlanabilir (85, 98). Deney deseninde yer alan %5 co-solvan etanol ilavesi ile 60 °C, 160 bar ekstresinde (IC₅₀: 0,85 mg/mL) 40 °C, 120 bar ekstresine (IC₅₀: 1,37 mg/mL) kıyasla 1,5 kat daha yüksek tirozinaz inhibitör aktivite elde edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında işaret edilen koşulların deneysel sonuçlar ile örtüşmesi sonucunda çalışılan parametre aralığında tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca süperkritik karbondioksit ekstraksiyon optimizasyonu sağlanmıştır. Ekstre içeriğindeki bileşenlerin miktar tayini çalışmalarında ise toplam fenol miktar tayini dışındaki yöntemler ile sonuç alınamamıştır. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile antosiyanin eldesini hedefleyen bir çalışmada uygun co-solvanın kullanılmasının yanısıra bitkisel materyalin içerisinde bulunan lipofilik bileşiklerin ilk basamakta saf karbondioksit ile temizlendikten sonra ikinci basamak olarak etanol ilavesi ile fenolik bileşiklerin eldesi açısından fayda sağlandığı belirtilmiştir (98, 99). Benzer şekilde başka çalışmalarca da önerilen iki basamaklı süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunun fraksiyonlama imkanı sağladığı ve co-solvan olarak etanol ile beraber su kullanımının seçici ekstraksiyon açısından fayda sağladığı bildirilmiştir (100, 101). Ekstrelerin toplam fenol miktarları ile tirozinaz inhibitör aktiviteleri arasında ise anlamlı ilişki tespit edilememiştir. Farklı süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu çalışmalarında da benzer şekilde hedef biyoaktif bileşen grubu ile aktivite arasında

doğrusal ilişkinin saptanamadığı durumlar bildirilmiştir (20, 67). Bu sonuçlar ışığında aktiviteden sorumlu olan ve toplam fenol tayininde reaksiyona katılmayan farklı grup bileşenlerin yer aldığı düşünülmektedir. En yüksek aktiviteyi sağlayan ekstre ile gerçekleştirilen fraksiyonlama çalışmaları sonucunda hekzan:etilasetat (85:15) fraksiyonunda ulaşılan 10,69 µg/mL IC₅₀ değeri referans ilaç olan kojik asit (IC₅₀: 4,10 µg/mL) ile kıyaslandığında önemli bir potansiyel teşkil etmektedir. Tez çalışması sonrasında da süperkritik karbondioksit ekstralarında tespit edilen aktiviteden sorumlu bileşenlerin tayinine yönelik çalışmalar projelendirilerek araştırmaların sürdürülmesi planlanmaktadır.

Subkritik Su Ekstraksiyon Optimizasyonu

Subkritik su ekstraksiyon optimizasyonu 150 bar basınç ile 40-80 °C sıcaklık; 20-60 dk ekstraksiyon süresi ve 2-6 ml/dk akış hızı aralığında yanıt yüzey metodolojisi Box-Benhken dizaynı kullanılarak toplam fenol, flavonoit, antosiyanin miktarı, LC-MS/MS antosiyanin miktarı ve tirozinaz inhibitör aktivite cevapları uyarınca optimize edilmiştir. Konvansiyonel koşullar ile karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla optimizasyon çalışması subkritik altı bölge olan 100 °C altında gerçekleştirilmiş; optimizasyon sonucu saptanan koşullar 100 °C ve 120 °C subkritik su koşullarında çalışılmıştır. İstatistiksel model p-değerinin toplam fenol miktarı açısından 0,0040 (R²: 0,9833), toplam flavonoit miktarı açısından 0,0063 (R²: 0,9927), toplam antosiyanin miktarı açısından 0,0067 (R²: 0,9266), LC-MS/MS antosiyanin miktarı açısından 0,0157 (R²: 0,9002) ve tirozinaz inhibitör aktivite açısından 0,0173 (R²: 0,9644) olarak bulunması tüm hedef cevaplar açısından istatistiksel model ile deneysel sonuçların uyumlu olduğunu göstermiştir. Tüm hedef cevaplar uyarınca p-değerinin istatistiksel olarak anlamlı olması optimizasyon çalışmasında yer alan bağımsız değişken parametreler uyarınca model tahminlerinin doğruluğuna işaret etmektedir. Toplam fenol miktarı açısından sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve akış hızı, toplam flavonoit ve tirozinaz inhibitör aktivite açısından sıcaklık ve ekstraksiyon süresi, toplam antosiyanin ve LC-MS/MS antosiyanin miktarları açısından ise ekstraksiyon süresi ve akış hızı anlamlı etkiye sahip parametreler olarak bulunmuştur. Optimum olarak tespit edilen 60 °C sıcaklıkta ekstraksiyon süresi ve akış hızının etkisi incelendiğinde akış hızı 2 ml/dk ile en düşük değerde iken 60 dk'ya ulaşan ekstraksiyonlarda en yüksek tirozinaz inhibitör aktivite sonuçları elde edilmiştir. Bu durum biyoaktif bileşenlerin eldesi açısından 60 dk yeterli zamanı

sağlarken akış hızının en düşük düzey olan 2 ml/dk'da (SCW1, 2ml/dk, %65 inhibisyon, IC₅₀: 1,84 mg/mL) tutulmasının drog ile temasa giren çözücü miktarınının kısıtlanması ile biyoaktif bileşenler açısından daha seçici bir ekstraksiyonun oluşturulduğu şeklinde değerlendirilebilir. Zira akış hızının yükseltildiği ekstraksiyon koşullarında çözücü miktarında sağlanan artış ile birlikte tirozinaz inhibitör aktivitede %20 azalma meydana gelmiştir (SCW6, %52 inhibisyon); çözücü miktarındaki artışın biyoaktif bileşenlerin yanısıra aktivite göstermeyen içeriğin ekstraksiyonunda da artışa sebep olduğu söylenebilir. Literatürde de artan ekstraksiyon sürelerinin toplam fenol ve flavonoit miktarlarında düşüşe sebep olabildiği bildirilmiştir (102). 60 dk ekstraksiyon süresinde sıcaklık ve akış hızının etkisi incelendiğinde 2 ml/dk akış hızı ile 60 °C'de en yüksek toplam fenol (28,65 mg GAE/g ekstre) ve antosiyanin miktarlarına (9,65 mg siy-3-gliE/g ekstre) ulaşılır iken toplam flavonoit miktarı açısından en iyi değer 80 °C olarak tespit edilmiştir. 60 °C'nin altında ve üstündeki sıcaklık değerlerinde 2 ml/dk üzerindeki akış hızlarında tirozinaz inhibitör aktivite açısından önemli düşüşler izlenmiştir. 4 ml/dk akış hızında 80 °C'ye çıkıldığında sadece total flavonoit miktarı üst düzeyde kalırken tirozinaz inhibitör aktivitede 18 kat düşüş gözlenmiştir. Optimize koşullar olarak tespit edilen 60 °C sıcaklık ve 2 ml/dk akış hızı değerlerinde 100 °C ve 120 °C ile subkritik su ekstraksiyonu çalışmaları yürütülmüştür. 100 °C ve 120 °C ekstrelerinde 60 °C'ye kıyasla antosiyanin miktarı 9 kat azalırken toplam fenol miktarında %63 ve %38, toplam flavonoit miktarında ise %183 ve %79 artış sağlanmıştır. Antosiyaninlerin yanı sıra *Morus nigra* meyvelerinde bulunan fenolik yapıları farklı bileşikler ile flavonoitlerin de tirozinaz inhibitör aktivitelerinin bulunduğu belirlenmiştir. Tez çalışması bulguları ile benzer şekilde fenolik bileşikler ile flavonoitlerin tirozinaz inhibitör aktiviteye sahip olduğu literatürde bildirilmiştir (94, 96). 100 °C (IC₅₀: 1,48 mg/mL) ve 120 °C (IC₅₀: 1,71 mg/mL) subkritik su ekstrelerinde yükselen toplam fenol miktarlarına (46,71 mg GAE/g ekstre ve 39,67 mg GAE/g ekstre) bağlı olarak beklenmedik tirozinaz inhibitör aktivite artışı, bilinen biyoaktif bileşen gruplarının tümüne yönelik ekstraksiyon optimizasyonu çalışmalarının yürütülmesi gerektiğine işaret etmektedir. Diğer subkritik su ekstraksiyonu çalışmalarında da benzer sonuçlar saptanmıştır. 100 °C üzerindeki sıcaklıklarda subkritik su ekstraksiyonunda antosiyanin miktarında ciddi düşüş meydana gelirken (103) toplam fenol ve flavonoit miktarlarında önemli artış sağlandığı tespit edilmiştir (104, 105). Antosiyanin miktarlarındaki düşüşe

karşın aktivite cevabında artış sağlandığı kaydedilmiştir (103). Farklı subkritik su ekstraksiyonu çalışmalarında ise yükselen sıcaklık değerleri ile aktivite cevabında artış kaydedildiği ancak bu durumun toplam fenol ve flavonoit miktarları ile ilişkilendirilemediği bildirilmiştir (106). Ekstrelerin tirozinaz inhibitör aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada ise fenolik asit ve flavonoit bakımından zengin ekstrelerin kojik aside kıyasla kayda değer tirozinaz inhibitör aktiviteye sahip olduğu ve bu durumun tirozinaz aktivite bakımından ekstrelerin fenolik ve flavonoit içeriğinin önemine işaret ettiği belirtilmiştir (95). Aynı zamanda toplam fenol ve flavonoit miktar tayininde referans alınan galik asit ve kersetinin tirozinaz inhibitör aktivite gösterdiği farklı araştırmalarda gösterilmiş olması (107-110) aktivite kompozisyon ilişkisinin ortaya konmasında toplam fenol ve flavonoit miktar tayinlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Tez çalışması sonuçları ve literatür verileri ışığında 100 °C ve 120 °C subkritik su ekstrelerinde elde edilen daha yüksek tirozinaz inhibitör aktivite sonuçlarının antosiyanin miktarlarındaki ciddi düşüşe rağmen artan toplam fenol ve flavonoit miktarları ile ilişkili olduğu değerlendirilebilir. Bu durum antosiyanince zengin bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstrelerde bulunan farklı bileşenlerin de aktivite cevabına etki edebileceğini göstermektedir. Subkritik su ekstraksiyonunda sıcaklık değerlerindeki artış ile beraber suyun polaritesinde azalmanın sağlanması ile beraber difüzyon ve çözme gücündeki artış sayesinde fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu açısından daha elverişli koşulların oluşturulabildiği de farklı çalışmalarda bildirilmiştir (111, 112). 80 °C sıcaklıkta 20 dk'lık ekstraksiyon süresinde elde edilen ekstrelerde tirozinaz inhibitör aktivitede (%60 inhibisyon) önemli bir düşüş gözlenmemiştir. Yüksek sıcaklık değerine karşın nispeten kısa ekstraksiyon süresinde antosiyaninlerin bozulmadan korunabildiği (6,32 mg siy-3-gliE/g ekstre) miktar tayini sonuçları ile de belirlenmiştir.

Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Optimizasyonu

Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonunda 35 °C'de 1:50 drog:çözücü oranı ile 300-700 watt mikrodalga gücü, %0-70 etanol oranı ve 5-15 dk ekstraksiyon süresi aralığında yanıt yüzey metodolojisi Box-Benken dizaynı kullanılmıştır. Hedef cevaplar olarak ise biyoaktif bileşen gruplarına yönelik spektrofotometrik toplam fenol, flavonoit, antosiyanin miktarları ile LC/MS-MS antosiyanin miktarı ve tirozinaz inhibitör aktivite çalışılmıştır. İstatistiksel model p-değerinin toplam fenol miktarı açısından 0,0138 (R^2 : 0,9048), toplam flavonoit

miktarı açısından 0,0259 ($R^2:0,8803$), toplam antosiyanin miktarı açısından 0,0145 ($R^2: 0,9675$), LC-MS/MS antosiyanin miktarı açısından 0,0088 ($R^2: 0,9909$) ve tirozinaz inhibitör aktivite açısından 0,0119 ($R^2: 0,9707$) olarak bulunması tüm hedef cevaplar açısından istatistiksel model ile deneysel sonuçlarının uyum içerisinde bulunduğunu göstermiştir. Optimizasyon çalışmasında bağımsız değişken parametrelerden toplam fenol ve antosiyanin miktarı açısından etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresi, LC-MS/MS antosiyanin miktarı açısından mikrodalga gücü, etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresi, tirozinaz inhibitör aktivite bakımından etanol konsantrasyonu anlamlı etkiye sahip parametreler olarak bulunmuştur. Optimum ekstraksiyon süresi olarak belirlenen 10 dk boyunca mikrodalga gücü ve etanol konsantrasyonunun antosiyanin eldesine yönelik etkileri incelendiğinde %0 oranında sabit kalan etanol değerlerinde artan mikrodalga gücünün ekstrelerde antosiyanin miktarında artış sağladığı belirlenmiştir. Mikrodalga gücündeki artış ile kullanılan etanol miktarı yükseltildiğinde ise antosiyanin miktarlarında düşüş gözlenmiştir. 3D grafikler ile yanıt yüzeyi incelendiğinde antosiyanin eldesi açısından mikrodalga gücü ile etanol miktarının ters orantılı olduğu tespit edilmiştir. 500 watt'a kadar uygulanan mikrodalga gücünün antosiyanin miktarında artış sağladığı, daha üst değerlere çıkıldığında ise düşüşe sebep olduğu belirlenmiştir. Mikrodalga gücünün 300 ile 500 watt aralığında uygulandığı durumlarda ise etanol miktarının %35'e çıkarılması antosiyanin miktarında artış sağlamış ve %70 etanol miktarına kadar çalışıldığı durumlarda ekstrelerin antosiyanin miktarları en üst değerlere ulaşmıştır. 300 watt %70 etanol ekstresinde 12,73 mg siy-3-gliE/g ve 500 watt %35 etanol ekstresinde 12,63 mg siy-3-gliE/g ekstre ile eşdeğer oranda toplam antosiyanin miktarına ulaşılmıştır. Polar çözücülerin apolar çözücülere kıyasla daha yüksek mikrodalga soğurma özelliğine sahip olması nedeniyle ekstraksiyon çözücü karışımları içerisinde suyun kullanımı ile daha yüksek oranda biyoaktif bileşen eldesinin sağlanabileceği literatürde de bildirilmiştir (113, 114). Çözücülerin mikrodalga soğurma özellikleri dikkate alındığında mikrodalga ekstraksiyonlarında kullanılacak çözücünün belirlenmesinin konvansiyonel çözücü ekstraksiyonlarına göre değişiklik gösterebileceği de belirtilmiştir. Ayrıca çözücü karışımında suyun yer aldığı mikrodalga uygulamalarında "superheating fenomen" olarak adlandırılan maddenin ısı olarak yayabileceği kapasitenin üstünde mikrodalga enerjisi soğurması durumu da ortaya çıkabildiği belirtilmiştir (115). Çözücü olarak suyun kullanıldığı ekstraksiyon çalışmalarında sıcaklık değerlerindeki yükselişin

difüzyon ve çözme gücünde artış sağlayarak daha yüksek fenolik bileşen elde edilmesini sağladığı geçmiş çalışmalarda saptanmıştır (111, 112). Benzer şekilde tez çalışmasında elde edilen verilere göre de antosiyaninlerin elde edilmesi açısından mikrodalga gücünde artış sağlayarak daha düşük etanol miktarı ile ekstraksiyonun mümkün olabileceği tespit edilmiştir. Optimizasyon çalışması uyarınca organik çözücü ihtiyacını önemli oranda azaltan ekstraksiyon parametreleri saptanabilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde mikrodalga kullanımının, bitkisel materyalden çözücü yönünde daha yüksek oranda kütle transferinin mümkün olabilmesi ile biyoaktif bileşenlerin elde edilmesi bakımından fayda sağlayabileceği belirtilmiştir (116). Ekstraksiyon çözücüsü kompozisyonunda yapılan ayarlamalar ile de hedef bileşenlere yönelik olarak daha yüksek seçiciliğe sahip sistemlerin oluşturulması mümkün olabilmektedir. Farklı *Morus* türlerinden antosiyaninlerin mikrodalga destekli ekstraksiyonunun hedeflendiği bir çalışmada 2 dk ekstraksiyon süresinde 425 watt mikrodalga gücü ve %60 etanol konsantrasyonu optimum değerler olarak tespit edilmiştir (6). Optimum etanol miktarı olarak belirlenen %70 etanol konsantrasyonunda mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin antosiyaninlerin elde edilmesi bakımından belirgin etkiye sahip olduğu bulunmuştur. 300 ve 500 watt mikrodalga gücünde 10 dk ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktlerde en yüksek antosiyanin miktarlarına ulaşılmıştır (12,73 ve 12,63 mg siy-3-gliE/g kuru ekstre). Başka bir antosiyanin ekstraksiyon optimizasyonu çalışmasında 366 watt, 12 dk, %85 etanol değerleri optimum parametreler olarak bildirilmiştir (117). Bir diğer çalışmada ise antosiyaninlerin elde edilmesi açısından ekstraksiyon çözücüsünde bulunması gereken optimum etanol oranı %55 olarak belirtilmiştir (118). Tez çalışmasında mikrodalga gücünün 500 watt'a çıkarılması ile kullanılan organik çözücü (etanol) miktarının yarıya düşürülebileceği (%70'den %35'e) ve bu koşullarda optimum ekstraksiyon süresinin 10 dk olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde bir başka mikrodalga ekstraksiyon optimizasyonu çalışmasında flavonoller ve antosiyaninlerin elde edilmesi açısından 540 watt mikrodalga gücü ile 10 ila 15 dk ekstraksiyon süresi aralığında optimizasyonun sağlandığı bildirilmiştir (119). Tez çalışmasında ise ekstraksiyon süresi 15 dk'ya uzatıldığında (MW10: 10,48 mg siy-3-gliE/g ekstre) toplam fenol ve flavonoid miktarlarında önemli bir değişim olmazken antosiyanin miktarında %18'lik düşüş ve buna bağlı olarak tirozinaz inhibitör aktivitede %21 kayıp yaşanmıştır. Bu sonuçlar ile benzer şekilde farklı çalışmalarca da uzayan ekstraksiyon sürelerinin hedef biyoaktif bileşenler ile eşzamanlı olarak aktivite

göstermeyen içeriğin ekstraksiyonunda artışa sebep olabildiği belirtilmiştir (120). Uzun ekstraksiyon süreleri ile çalışılması durumunda da biyoaktif bileşen miktarı ile ekstraksiyon süresi arasında doğrusal ilişkinin bulunmadığı da bildirilmiştir (102, 121). İlave olarak uzayan ekstraksiyon sürelerinin biyoaktif bileşenlerin bozulmasına sebep olduğunu rapor eden çalışmalar da bulunmaktadır (122). En düşük antosiyanin miktarları 8,16 ve 8,41 mg siy-3-gliE/g ekstre değerleri ile 300 watt 10dk ve 700 watt 15 dk ekstrelerinde saptanmıştır. 10 dk'nın optimum ekstraksiyon süresi olarak belirlenmesine karşın 300 watt ekstraksiyonunda %0 etanol ile çalışıldığı durumlarda çözücü sisteminin antosiyanin eldesine yönelik yeterli çözme gücüne ulaşamadığı söylenebilir. 15 dk'ya çıkan ekstraksiyon sürelerinde ise antosiyaninler açısından ekstraksiyon işlemi seçiciliğini yitirdiği için antosiyanin miktarlarında düşüşe sebep olduğu değerlendirilmektedir. Deneysel sonuçlara paralel olarak Box-Benken dizaynının işaret ettiği üzere 10 dk optimum ekstraksiyon süresi antosiyanin eldesi bakımından seçiciliği en yüksek koşul olarak tespit edilmiştir. Antosiyaninlerin mikrodalga destekli ekstraksiyonuna yönelik başka bir araştırmada da 10 dk olarak belirlenen optimum ekstraksiyon süresinin 300 dk süren konvansiyonel ekstraksiyona kıyasla önemli avantaj sağladığı belirlenmiştir (123). Optimizasyon çalışması sayesinde elde edilen ekstrelerde antosiyanin miktarı korunurken ekstraksiyon işleminin süresinin kısaltılması mümkün olabilmıştır. Geçmiş çalışmalarca da mikrodalga destekli ekstraksiyonun mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresi parametreleri göz önünde bulundurulduğunda konvansiyonel çözücü ekstraksiyonuna göre en büyük avantajının işlem sürelerinin kısaltılması ile aktif bileşenlerin bozulmadan korunması olarak gösterilmiştir (124). Sabit mikrodalga gücünde değişken etanol miktarı ve ekstraksiyon süresinin etkileri incelendiğinde 5 ile 15 dk süre aralığında %35 etanol konsantrasyonu altında gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda antosiyanin miktarlarında düşüş olduğu belirlenmiştir. En düşük antosiyanin miktarı 8,16 mg/g ile 10 dk %0 etanol ekstresinde tespit edilmiştir. Dizayn tarafından optimum koşullar olarak işaret edilen 300 watt %70 etanol ekstraksiyonu ile antosiyanin miktarı ve tirozinaz inhibitör aktivite açısından eşdeğer sonuçlara deneysel olarak 500 watt %35 etanol ekstraksiyonunda ulaşılmıştır. Antosiyaninlerin farklı bitkilerden ekstraksiyonunun araştırıldığı bir çalışmada 300 watt mikrodalga gücünde 10 dk ekstraksiyon süresi ile optimizasyonun sağlanması mikrodalga sıcaklığı olarak 70 °C kullanılmasının sonucunda olabileceği değerlendirilmektedir (125). 300 watt ve 500 watt ekstraksiyonları için yanıt yüzeyi

incelendiğinde 10 dk ekstraksiyon süresinde etanol miktarını yarıya kadar azaltma sağlanırken 1,63 mg/mL ve 1,67 mg/mL olarak saptanan IC₅₀ değerleri ile tirozinaz inhibitör aktivitede kayıp yaşanmadığı saptanmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon optimizasyonu sonucunda toplam fenol miktarı açısından 300 watt %70 etanol 15 dk, toplam flavonoid miktarı açısından 300 watt %0 etanol 10 dk, toplam antosiyanin ve LC-MS/MS antosiyanin miktarları açısından 300 watt %70 etanol 10 dk ve tirozinaz inhibitör aktivite cevabı açısından 500 watt %35 etanol 10 dk optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Sonuçlar ile uyumlu olarak başka bir araştırmada da antosiyaninlerin eldesi için %40 etanol oranı optimum değer olarak belirlenmiştir (126). Ekstraksiyon çözücüsü olarak %95 etanol ile antosiyanin eldesinin araştırıldığı çalışmada ancak 800 watt mikrodalga gücünde 15 dk ekstraksiyon süresi ile başarı sağlanabilmiştir (127). Bir diğer çalışmada ise %100 etanol kullanımında antosiyaninlerin mikrodalga destekli ekstraksiyonu için optimum süre olarak 50 dk belirlenmiştir (128). Her iki durumda da yüksek etanol oranı sebebiyle kısıtlanan ekstraksiyon kabiliyeti sonucunda uygulanan güç ve sürenin zorunlu olarak artırıldığı düşünülebilir. Tez çalışmasında ilave olarak organik çözücü miktarının azaltılmasına yönelik drog:çözücü oranı 1:10 olacak şekilde optimum olarak belirlenen 500 watt %35 etanol 10 dk koşullarında ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonucunda 13,28 mg siy-3-gliE/g ekstre antosiyanin miktarı ile tirozinaz inhibitör aktivite IC₅₀ değeri 1,44 mg/mL değerine ulaşılmıştır. Konvansiyonel çözücü ekstraksiyonuna (105 ml etanol, 12,69 mg siy-3-gliE/g ekstre, IC₅₀: 2,61 mg/mL) kıyasla mikrodalga destekli ekstraksiyonda (8,75 ml etanol, 13,28 mg siy-3-gliE/g ekstre, IC₅₀:1,44 mg/mL) 12 kat daha düşük miktarda etanol kullanımı ile daha yüksek antosiyanin içeriğine sahip tirozinaz inhibitör aktivitesi daha güçlü ekstre eldesi mümkün olabilmektedir.

Büyük Ölçeğe Yönelik Farklı Bitkisel Kaynaklar ile Çalışmalar

Optimize edilen subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri ile üretim ve büyük ölçekli çalışmalara kaynak sağlanmasına yönelik olarak antosiyanince zengin farklı bitkisel kaynaklar olan zirai kültür formları *Raphanus sativus* 'Red Meat' kök ve *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* topraküstü kısımları ile çalışmalar yürütülmüştür. *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* topraküstü kısımları ve *Raphanus sativus* 'Red Meat' kök kısımlarının konvansiyonel çözücü ekstrelerinde 27,50 ve 11,51 mg GAE/g ekstre toplam fenol, 2,68 ve 0,69 mg

KE/g ekstre toplam flavonoit, 9,66 ve 3,66 mg siy-3-gliE/g ekstre toplam antosiyanin miktarları elde edilmiştir. İleri ekstraksiyon yöntemlerinin optimizasyonu ile belirlenmiş optimum koşullar ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda ise *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* ve *Raphanus sativus* ‘Red Meat’ optimize subkritik su ekstraksiyonunda 31,02 ve 12,04 mg GAE/g ekstre toplam fenol, 2,38 ve 0,65 mg KE/g ekstre toplam flavonoit, 8,27 ve 1,76 mg siy-3-gliE/g ekstre toplam antosiyanin miktarları elde edilmiştir. Optimize mikrodalga destekli ekstraksiyonlarda *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* ve *Raphanus sativus* ‘Red Meat’ ekstraktlerinde 31,74 ve 13,97 mg GAE/g ekstre toplam fenol, 3,43 ve 1,03 mg KE/g ekstre toplam flavonoit, 11,77 ve 5,82 mg siy-3-gliE/g ekstre toplam antosiyanin miktarları elde edilmiştir. Hedef aktif bileşenler olarak antosiyaninler başta olmak üzere büyük ölçek çalışmalar açısından *Raphanus sativus* ‘Red Meat’ kök kısımlarından elde edilen ekstraktlerin *Morus nigra* meyve ekstraktlerine alternatif olamayacağı tespit edilmiştir. *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* topraküstü kısımlarından elde edilen ekstraktlerde ise *Morus nigra* meyve ekstraktlerine yaklaşan aktif içerik miktarları saptanmıştır. Tirozinaz inhibitör aktivite açısından ise *Raphanus sativus* ‘Red Meat’ optimize mikrodalga ekstresinin IC₅₀ değeri 1,95 mg/mL ve optimize subkritik su ekstresinin IC₅₀ değeri 4,14 mg/mL olarak tespit edilmiştir. *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* optimize mikrodalga ekstresi IC₅₀ değeri 1,26 mg/mL ve optimize subkritik su ekstresi IC₅₀ değeri 3,03 mg/mL olarak saptanmıştır. Sonuçlar uyarınca analiz edilen bileşen gruplarının miktarları ile tirozinaz inhibitör aktivite arasında doğrusal bir ilişkinin bulunduğu belirlenmiştir. Yüksek miktarlarda üretiminin bulunması ve ekonomik olarak kolay ulaşılabilir olması dolayısıyla *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* bitkisinin tirozinaz inhibitör aktiviteye sahip antosiyanince zengin ekstre eldesi açısından ilaç endüstrisine yönelik büyük ölçekli çalışmalara elverişli olduğu değerlendirilebilir. Optimum ekstraksiyon koşullarının farklı bitkisel materyallerde uygulandığında da konvansiyonel çözücü ekstraktlerine kıyasla biyoaktif bileşen miktarlarında belirgin artış sağlaması (toplam fenol miktarında %40, toplam flavonoit miktarında %107 ve toplam antosiyanin miktarında %91 oranında artış sağlanmıştır), tespit edilen optimum ekstraksiyon koşullarının farklı droglarda uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Tez çalışması sonrasında bu droglar ile de detaylı çalışmaların projelendirilerek yürütülmesi planlanmaktadır.

Sonuç olarak *Morus nigra* meyvelerinin ileri ekstraksiyon teknolojileri olarak tanımlanan süperkritik karbondioksit, subkritik su ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri ile optimizasyonu tirozinaz inhibitör aktivite cevabı uyarınca yanıt yüzey metodolojisi Box-Benken dizayn kullanılarak sağlanmıştır. Konvansiyonel çözücü ekstraksiyonu sistemleri ile karşılaştırmalı olarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Ekstrelerin sahip olduğu toplam fenol, flavonoit ve antosiyanin miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. UPLC-DAD-ESI-MS/MS ile siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glukozit ve pelargonidin-3-rutinozitin kalitatif ve kantitatif analizleri tamamlanmıştır. Enzim inhibisyon kinetik çalışmaları ile geliştirilen tirozinaz inhibitör aktivite protokolü ile *Morus nigra* meyve ekstralarının ve fraksiyonlarının tirozinaz inhibitör aktivite potansiyelleri sunulmuştur. Total ekstraların, referans ilaç olan kojik aside (IC_{50} : 4,10 $\mu\text{g/mL}$) kıyasla tirozinaz inhibitör aktiviteleri çok düşük kalmış; fraksiyonlarının ise önemli aktivite potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. 70:29:1 etanol:su:TFA konvansiyonel çözücü ekstralarının tirozinaz inhibitör aktivite IC_{50} değeri 2,69 mg/mL; optimize süperkritik karbondioksit ekstresi IC_{50} değeri 0,342 mg/mL ve 85:15 hekzan:etilasetat fraksiyonu IC_{50} değeri 10,69 $\mu\text{g/mL}$; optimize subkritik su ekstresi IC_{50} değeri 1,48 mg/mL ve 60:40 su:etanol fraksiyonu IC_{50} değeri 86,75 $\mu\text{g/mL}$; optimize mikrodalga ekstresi IC_{50} değeri 1,44 mg/mL ve 60:40 su:etanol fraksiyonu IC_{50} değeri 166 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. LC-MS/MS ile 60:40 su:etanol fraksiyonlarında (toplam antosiyanin miktarı 418,22 mg siy-3-gliE/g ekstre) bulunan ana bileşenlerin siyanidin-3-glikozit (293,10 mg/g ekstre) ve siyanidin-3-rutinozit (125,12 mg siy-3-gliE/g ekstre) olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışması ile *Morus nigra* meyvelerinden antosiyanince zengin tirozinaz inhibitör etkili ekstraların eldesine yönelik olarak konvansiyonel çözücü ekstraksiyonu metotlarına kıyasla organik çözücü miktarı, ekstraksiyon süresi, kullanılan enerji ve drog ihtiyacı ile toksik kalıntı riskini azaltan, biyoaktif bileşenler açısından seçiciliği daha yüksek ileri ekstraksiyon metotlarının optimizasyonu sağlanmış, kompozisyon aktivite ilişkisi aydınlatılmıştır. Tez sonrası çalışmalar olarak süperkritik karbondioksit ekstralarında tirozinaz inhibitör aktiviteyi sağlayan bileşenlerin tespiti ve bunların eldesine yönelik çalışmalar planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. WHO. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva: WHO; 2002.
2. Bochot C, Favre E, Dubois C, Baptiste B, Bubacco L, Carrupt PA, Gellon G, Hardre R, Luneau D, Moreau Y, Nurisso A, Reglier M, Serratrice G, Belle C, Jamet H. Unsymmetrical binding modes of the HOPNO inhibitor of tyrosinase: from model complexes to the enzyme. *Chemistry* 2013;19:11:3655-64.
3. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 2009;10:6:2440-75.
4. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:15:1707-23.
5. Natic MM, Dabic DC, Papetti A, Aksic MMF, Ognjanov V, Ljubojevic M, Tesic ZL. Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia. *Food Chem* 2015;171:128-36.
6. Zou TB, Wang DL, Guo HH, Zhu YN, Luo XQ, Liu FQ, Ling WH. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. *J Food Sci* 2012;77:1:C46-C50.
7. Zou TB, Wang M, Gan RY, Ling WH. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. *Int J Mol Sci Int J Mol Sci* 2011;12:5:3006-17.
8. Tchabo W, Ma YK, Engmann FN, Zhang HN. Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. *Ind Crop Prod* 2015;63:214-25.
9. Lee SH, Choi SY, Kim H, Hwang JS, Lee BG, Gao JJ, Kim SY. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 2002;25:8:1045-8.
10. Ryu YB, Ha TJ, Curtis-Long MJ, Ryu HW, Gal SW, Park KH. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus lhou* (S.) Koidz. *J Enzym Inhib Med Ch* 2008;23:6:922-30.
11. Wang S, Liu XM, Zhang J, Zhang YQ. An efficient preparation of mulberroside a from the branch bark of mulberry and its effect on the inhibition of tyrosinase activity. *Plos One* 2014;9:10.

12. Chang LW, Juang LJ, Wang BS, Wang MY, Tai HM, Hung WJ, Chen YJ, Huang MH. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. *Food Chem Toxicol* 2011;49:4:785-90.
13. Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Vieira W, Virador VM. Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells. *J Agr Food Chem* 2001;49:3:1620-4.
14. Kubo I, Kinst-Hori I. Flavonols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J Agr Food Chem* 1999;47:10:4121-5.
15. Parvez S, Kang M, Chung HS, Bae H. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: Mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res* 2007;21:9:805-16.
16. Yaltirik F. *Morus* in Flora of Turkey. In: Davis PH, editor. Edinburgh, UK.: Edinburgh University Press; 1982. p. 640-2.
17. Yalavarthi C, S. TV. A review on identification strategy of phyto constituents present in herbal plants. *Int J Res Pharm Sci* 2013;4:2:123-40.
18. Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda Y, Jiang YM. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - Engineering and technology. *Food Rev Int* 2005;21:1:139-66.
19. Yesil-Celiktas O, Otto F, Gruener S, Parlar H. Determination of extractability of pine bark using supercritical CO₂ extraction and different solvents: optimization and prediction. *J Agr Food Chem* 2009;57:2:341-7.
20. Kazan A, Koyu H, Turu IC, Yesil-Celiktas O. Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. *J Supercrit Fluid* 2014;92:55-9.
21. Florez N, Conde E, Dominguez H. Microwave assisted water extraction of plant compounds. *J Chem Technol Biotechnol* 2015;90:4:590-607.
22. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. *Farmasötik Botanik*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 2014.
23. Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E. *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları; 2011.
24. Zeybek N, Zeybek U. *Kapalı Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. İzmir: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi; 2002.
25. Ercisli S. A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genet Resour Crop Ev* 2004;51:4:419-35.

26. Vichasilp C, Nakagawa K, Sookwong P, Suzuki Y, Kimura F, Higuchi O, Miyazawa T. Optimization of 1-deoxynojirimycin extraction from mulberry leaves by using response surface methodology. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:12:2684-9.
27. Liu X, Xiao G, Chen W, Xu Y, Wu J. Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins. *J Biomed Biotechnol* 2004;2004:5:326-31.
28. Koca I, Ustun NS, Koca AF, Karadeniz B. Chemical composition, antioxidant activity and anthocyanin profiles of purple mulberry (*Morus rubra*) fruits. *J Food Agric Environ* 2008;6:2:39-42.
29. Qin C, Li Y, Niu W, Ding Y, Zhang R, Shang X. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. *Czech J Food Sci* 2010;28:2:117-26.
30. Song W, Wang HJ, Bucheli P, Zhang PF, Wei DZ, Lu YH. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *J Agr Food Chem* 2009;57:19:9133-40.
31. Kojima Y, Kimura T, Nakagawa K, Asai A, Hasumi K, Oikawa S, Miyazawa T. Effects of Mulberry Leaf Extract Rich in 1-Deoxynojirimycin on Blood Lipid Profiles in Humans. *J Clin Biochem Nutr* 2010;47:2:155-61.
32. Sarikaphuti A, Nararatwanchai T, Hashiguchi T, Ito T, Thaworanunta S, Kikuchi K, Oyama Y, Maruyama I, Tancharoen S. Preventive effects of *Morus alba* L. anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Exp Ther Med* 2013;6:3:689-95.
33. Chen YC, Tien YJ, Chen CH, Beltran FN, Amor EC, Wang RJ, Wu DJ, Mettling C, Lin YL, Yang WC. *Morus alba* and active compound oxyresveratrol exert anti-inflammatory activity via inhibition of leukocyte migration involving MEK/ERK signaling. *Bmc Complem Altern M* 2013;13:45.
34. Du Q, Zheng J, Xu Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *J Food Compos Anal* 2008;21:5:390-5.
35. Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885). Available from <http://www.biolib.de>.
36. Lim TK. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Netherlands: Springer; 2012.

37. Babac MT. Possibility of an information system on plants of South-West Asia with particular reference to the Turkish Plants Data Service (TUBIVES). *Turk J Bot* 2004;28:119-27.
38. Ercisli S, Celik H. Mulberry and blueberry cultivation in Turkey. *Pomologia Croatia* 2008;14:281-8.
39. Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chem* 2007;103:4:1380-4.
40. Gundogdu M, Muradoglu F, Sensoy RIG, Yilmaz H. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Sci Hortic-Amsterdam* 2011;132:37-41.
41. Pawlowska AM, Oleszek W, Braca A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *J Agr Food Chem* 2008;56:9:3377-80.
42. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999.
43. Koyuncu F. Organic acid composition of native black mulberry fruit. *Chem Nat Comp* 2004;40:4:367-9.
44. Kostic DA, Dimitrijević DS, Mitic SS, Mitic MN, Stojanović GS, Zivanovic AV. Phenolic content and antioxidant activities of fruit extracts of *Morus nigra* L. (Moraceae) from Southeast Serbia. *Trop J Pharm Res* 2013;12:1:105-10.
45. Koyuncu F, Çetinbas M, Erdal İ. Nutritional constituents of wild-grown black mulberry (*Morus nigra* L.). *J Appl Bot Food Qual.* 2014 2014;87.
46. Fazaeli M, Hojjatpanah G, Emam-Djomeh Z. Effects of heating method and conditions on the evaporation rate and quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. *J Food Sci Tech* 2013;50:1:35-43.
47. Ercisli S, Orhan E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Sci Hortic-Amsterdam* 2008;116:1:41-6.
48. Veberic R, Slatnar A, Bizjak J, Stampar F, Mikulic-Petkovsek M. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Sci Tech* 2015;60:1:509-17.
49. Dugo P, Mondello L, Errante G, Zappia G, Dugo G. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *J Agr Food Chem* 2001;49:8:3987-92.

50. Ercisli S, Tosun M, Duralija B, Voca S, Sengu M, Turan M. Phytochemical content of some black (*Morus nigra* L.) and purple (*Morus rubra* L.) mulberry genotypes. *Food Technol Biotech* 2010;48:1:102-6.
51. Ozgen M, Serce S, Kaya C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Sci Hortic-Amsterdam* 2009;119:3:275-9.
52. Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Oroojy H, Afshin-Nia F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytother Res* 2004;18:5:365-9.
53. Volpato GT, Calderon IMP, Sinzato S, Campos KE, Rudge MVC, Damasceno DC. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2011;138:3:691-6.
54. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem* 2003;64:5:923-33.
55. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phytother Res* 2016;30:8:1265-86.
56. Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci Tech* 2005;16:9:423-8.
57. Woodward G, Kroon P, Cassidy A, Kay C. Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *J Agr Food Chem* 2009;57:12:5271-8.
58. de Melo MMR, Silvestre AJD, Silva CM. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J Supercrit Fluids* 2014;92:115-76.
59. Reverchon E, De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J Supercrit Fluids* 2006;38:2:146-66.
60. Herrero M, Cifuentes A, Ibañez E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem* 2006;98:1:136-48.
61. Romanik G, Gilgenast E, Przyjazny A, Kamiński M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J Biochem Bioph Meth* 2007;70:2:253-61.

62. Xu Y, Stokes AH, Freeman WM, Kumer SC, Vogt BA, Vrana KE. Tyrosine mRNA is expressed in human substantia nigra. *Mol Brain Res* 1997;45:1:159-62.
63. Barnes JS, Nguyen HP, Shen S, Schug KA. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009;1216:23:4728-35.
64. Boeing JS, Barizao EEO, Silva BCE, Montanher PF, Almeida VD, Visentainer JV. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem Cent J* 2014;8.
65. AOAC. Official Method 2005.02 Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines. *J AOAC Int* 2005;88:1269.
66. Arapitsas P, Turner C. Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta* 2008;74:5:1218-23.
67. Seabra IJ, Braga MEM, Batista MTP, de Sousa HC. Fractioned high pressure extraction of anthocyanins from elderberry (*Sambucus nigra* L.) pomace. *Food Bioprocess Technol* 2010;3:5:674-83.
68. Seabra IJ, Braga MEM, Batista MT, de Sousa HC. Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *J Supercrit Fluid* 2010;54:2:145-52.
69. Dias ALS, Rozet E, Chataigne G, Oliveira AC, Rabelo CAS, Hubert P, Rogez H, Quetin-Leclercq J. A rapid validated UHPLC-PDA method for anthocyanins quantification from Euterpe oleracea fruits. *J Chromatogr B* 2012;907:108-16.
70. Chang TS, Ding HY, Tai SSK, Wu CY. Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chem* 2007;105:4:1430-8.
71. Abirami A, Nagarani G, Siddhuraju P. In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. *Food Science and Human Wellness* 2014;3:1:16-25.
72. Sirat HM, Rezali MF, Ujang Z. Isolation and identification of radical scavenging and tyrosinase inhibition of polyphenols from *Tibouchina semidecandra* L. *J Agr Food Chem* 2010;58:19:10404-9.

73. Abbasi AM, Khan MA, Ahmad M, Munir M, Zafar M, Sultana S, Mishvani ZR, Ullah Z. Ethnobotanical and taxonomic screening of genus *Morus* for wild edible fruits used by the inhabitants of Lesser Himalayas-Pakistan. *J Med Plant Res* 2014;8:25:889-98.
74. Koyuncu F, Vural E. Kara dut (*Morus nigra* L.) ağacının bazı organ ve dokularının morfolojik özellikleri. *Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu* 2003:418-23.
75. Nepal MP, Ferguson CJ. Phylogenetics of *Morus* (Moraceae) inferred from ITS and trnL-trnF sequence data. *Systematic Botany* 2012;37:2:442-50.
76. Kafkas S, Ozgen M, Dogan Y, Ozcan B, Ercisli S, Serce S. Molecular characterization of mulberry accessions in Turkey by AFLP markers. *J Am Soc Hortic Sci* 2008;133:4:593-7.
77. Gerasopoulos D, Stavroulakis G. Quality characteristics of four mulberry (*Morus* sp) cultivars in the area of Chania, Greece. *J Sci Food Agr* 1997;73:2:261-4.
78. Aydin S, Yilmaz Ö, Gökçe Z. Effectiveness of matured *Morus nigra* L. (black mulberry) fruit extract on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl (OH) radicals as compared to less matured fruit extract. *Afr J Biotechnol* 2011;10:71:16037-44.
79. Paes J, Dotta R, Barbero GF, Martinez J. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *J Supercrit Fluid* 2014;95:8-16.
80. Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J Agr Food Chem* 2003;51:7:1811-5.
81. Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem* 2005;53:10:4290-302.
82. Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* 2008;613:1:1-19.
83. Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, Gebhardt S. Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts. *J Agr Food Chem* 2006;54:26:9966-77.

84. Lin L-Z, Harnly JM. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *J Agr Food Chem* 2007;55:4:1084-96.
85. Pasquel Reátegui JL, Machado APdF, Barbero GF, Rezende CA, Martínez J. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *J Supercrit Fluids* 2014;94:223-33.
86. Copeland RA. Evaluation of Enzyme Inhibitors in drug discovery. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2013.
87. Neeley E, Fritch G, Fuller A, Wolfe J, Wright J, Flurkey W. Variations in IC(50) values with purity of mushroom tyrosinase. *Int J Mol Sci* 2009;10:9:3811-23.
88. Bae S-H, Suh H-J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT - Food Sci Tech* 2007;40:6:955-62.
89. Lee JH, Lim JD, Choung M-G. Studies on the anthocyanin profile and biological properties from the fruits of *Acanthopanax senticosus* (Siberian Ginseng). *J Funct Foods* 2013;5:1:380-8.
90. Garcia-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán FA. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochem Anal* 1998;9:6:274-7.
91. Yalavarthi S, Rangarao SP, Kumar SS, Supriya M. Diagnostic dilemma in a malignant cutaneous adnexal tumor. *Indian J Pathol Microbiol* 2013;56:3:331-33.
92. Giusti MM, Ghanadan H, Wrolstad RE. Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *J Agr Food Chem* 1998;46:12:4858-63.
93. Chaovanalikit A, Wrolstad RE. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *J Food Sci* 2004;69:1:FCT67-FCT72.
94. Lee SC, Chen CH, Yu CW, Chen HL, Huang WT, Chang YS, Hung SH, Lee TL. Inhibitory effect of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira ethanol extracts on melanin synthesis via repression of tyrosinase expression. *J Biosci Bioeng* 2016;122:3:263-9.
95. Maack A, Pegard A. *Populus nigra* (Salicaceae) absolute rich in phenolic acids, phenylpropanoids and flavonoids as a new potent tyrosinase inhibitor. *Fitoterapia* 2016;111:95-101.

96. Ninomiya K, Matsumoto T, Chaipech S, Miyake S, Katsuyama Y, Tsuboyama A, Pongpiriyadacha Y, Hayakawa T, Muraoka O, Morikawa T. Simultaneous quantitative analysis of 12 methoxyflavones with melanogenesis inhibitory activity from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *J Nat Med-Tokyo* 2016;70:2:179-89.
97. Paula JT, Paviani LC, Foglio MA, Sousa IMO, Duarte GHB, Jorge MP, Eberlin MN, Cabral FA. Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *J Supercrit Fluid* 2014;86:100-7.
98. Serra AT, Seabra IJ, Braga MEM, Bronze MR, de Sousa HC, Duarte CMM. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *J Supercrit Fluids* 2010;55:1:184-91.
99. Floris T, Filippino G, Scrugli S, Pinna MB, Argiolas F, Argiolas A, Murru M, Reverchon E. Antioxidant compounds recovery from grape residues by a supercritical antisolvent assisted process. *J Supercrit Fluid* 2010;54:2:165-70.
100. Paula JT, Paviani LC, Foglio MA, Sousa IMO, Cabral FA. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. *J Supercrit Fluid* 2013;81:33-41.
101. Palma M, Taylor LT, Varela RM, Cutler SJ, Cutler HG. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. *J Agr Food Chem* 1999;47:12:5044-8.
102. Talmaciu AI, Ravber M, Volf I, Knez Z, Popa VI. Isolation of bioactive compounds from spruce bark waste using sub- and supercritical fluids. *J Supercrit Fluid* 2016;117:243-51.
103. Monrad JK, Howard LR, King JW, Srinivas K, Mauromoustakos A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. *J Agr Food Chem* 2010;58:5:2862-8.
104. Ju ZY, Howard LR. Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *J Food Sci* 2005;70:4:S270-S6.
105. Aliakbarian B, Fathi A, Perego P, Dehghani F. Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *J Supercrit Fluid* 2012;65:18-24.

106. Pavlic B, Vidovic S, Vlastic J, Radosavljevic R, Cindric M, Zekovic Z. Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products-Process optimization by response surface methodology. *J Supercrit Fluid* 2016;116:36-45.
107. Gheibi N, Zavareh SH, Behbahani GRR, Haghbeen K, Sirati-sabet M, Ilghari D, Chegini KG. Comprehensive kinetic and structural studies of different flavonoids inhibiting diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Appl Biochem Micro+* 2016;52:3:304-10.
108. Roh HJ, Noh HJ, Na CS, Kim CS, Kim KH, Hong CY, Lee KR. Phenolic compounds from the leaves of *Stewartia pseudocamellia* Maxim. and their whitening activities. *Biomol Ther* 2015;23:3:283-9.
109. Fujii T, Saito M. Inhibitory effect of quercetin isolated from rose hip (*Rosa canina* L.) against melanogenesis by mouse melanoma cells. *Biosci Biotech Bioch* 2009;73:9:1989-93.
110. Arung ET, Furuta S, Ishikawa H, Kusuma IW, Shimizu K, Kondo R. Anti-melanogenesis properties of quercetin- and its derivative-rich extract from *Allium cepa*. *Food Chem* 2011;124:3:1024-8.
111. Osorio-Tobon JF, Carvalho PIN, Rostagno MA, Petenate AJ, Meireles MAA. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. *J Supercrit Fluid* 2014;95:167-74.
112. Garcia-Mendoza MP, Espinosa-Pardo FA, Baseggio AM, Barbero GF, Junior MRM, Rostagno MA, Martínez J. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from jucara(*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *J Supercrit Fluid* 2017;119:9-16.
113. Duval J, Pecher V, Poujol M, Lesellier E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Ind Crop Prod* 2016;94:812-33.
114. Veggi PC, Martinez J, Meireles MAA. Fundamentals of Microwave Extraction. In: Chemat F, Cravotto G, editors. *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*. New York: Springer Science+Business Media 2013. p. 18-9.
115. Jain T, Jain V, Pandey R, Vyas A, Shukla SS. Microwave assisted extraction for phytoconstituents - an overview. *Asian J Res Chem* 2009;2:1:19-25.

116. Chen FL, Zhang XL, Zhang Q, Du XQ, Yang L, Zu YG, Yang FJ. Simultaneous synergistic microwave-ultrasonic extraction and hydrolysis for preparation of trans-resveratrol in tree peony seed oil-extracted residues using imidazolium-based ionic liquid. *Ind Crop Prod* 2016;94:266-80.
117. Sun YZ, Liao XJ, Wang ZF, Hu XS, Chen F. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography mass spectrometry. *Eur Food Res Technol* 2007;225:3-4:511-23.
118. Zuo Y, Li Y, Zhao C, Xie H, Qi F, Liu L, Zhang J. Extraction of mulberry anthocyanin with assistance of microwave. *Adv Mater Res* 2013;610-613:3556-61.
119. Li XR, Chen FL, Li SY, Jia J, Gu HY, Yang L. An efficient homogenate-microwave-assisted extraction of flavonols and anthocyanins from blackcurrant marc: Optimization using combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design. *Ind Crop Prod* 2016;94:834-47.
120. Pan XJ, Niu GG, Liu HZ. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Process* 2003;42:2:129-33.
121. Rafiee Z, Jafari SM, Alami M, Khomeiri M. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J Anim Plant Sci* 2011;21:4:738-45.
122. Jeyaratnam N, Nour AH, Kanthasamy R, Nour AH, Yuvaraj AR, Akindoyo JO. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Ind Crop Prod* 2016;92:57-66.
123. Pap N, Beszedes S, Pongracz E, Myllykoski L, Gabor M, Gyimes E, Hodur C, Keiski RL. Microwave-assisted extraction of anthocyanins from black currant marc. *Food Bioprocess Technol* 2013;6:10:2666-74.
124. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* 2013;117:4:426-36.
125. Abdel-Aal el SM, Akhtar H, Rabalski I, Bryan M. Accelerated, microwave-assisted, and conventional solvent extraction methods affect anthocyanin composition from colored grains. *J Food Sci* 2014;79:2:C138-46.
126. Liazid A, Guerrero RF, Cantos E, Palma M, Barroso CG. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chem* 2011;124:3:1238-43.

127. Duan WK, Jin SP, Zhao GF, Sun PL. Microwave-assisted extraction of anthocyanin from Chinese bayberry and its effects on anthocyanin stability. *Food Sci Tech-Brazil* 2015;35:3:524-30.
128. Patil N, Datar A. Extraction, stability and separation of anthocyanins of *Ixora coccinea* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7:3:198-202.



ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İzmir’de doğdum. İlköğrenimimi Dokuz Eylül İlkokulu’nda, ortaokul ve lise öğrenimimi Bornova Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 2006 senesinde Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun oldum. 2006-2012 yılları arasında İzmir’de serbest eczacılık yaptım. 2006’da başladığım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik A.D. yüksek lisans programını 2010 senesinde bitirerek uzman eczacı ünvanı aldım. 2011 senesinde aynı anabilim dalında doktora öğrenimime başladım. 2012 senesinde ÖYP kadrosu ile atandığım İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik A.D.’de araştırma görevlisi olarak çalışmalarına devam etmekteyim.