

T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Phytolacca americana* (L.) BİTKİSİNİN BİYOAKTİF  
BİLEŞENLERİNİN HPLC-DAD İLE AYDINLATILMASI

ÜMRAN KALKAN

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ EMİNE AKYÜZ TURUMTAY

TEZ JÜRİLERİ

DOÇ. DR. EMRE MENTEŞE

DR. ÖĞR. ÜYESİ FATMA YAYLACI KARAHALİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

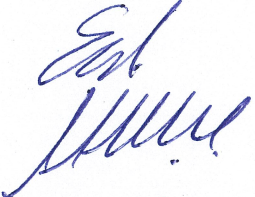
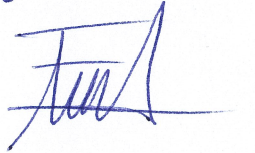
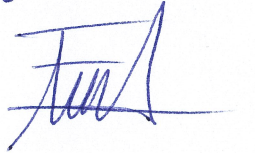
RİZE-2018

Her Hakkı Saklıdır

T.C.  
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Phytolacca americana* (L.) BİTKİSİNİN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN  
HPLC-DAD İLE AYDINLATILMASI

Dr. Öğr. Üyesi Emine AKYÜZ TURUMTAY danışmanlığında, Ümran KALKAN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 07/05/2018 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Emine AKYÜZ TURUMTAY	
Üye	: Doç. Dr. Emre MENTEŞE	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Fatma YAYLACI KARAHALİL	

  
Doç. Dr. Ferhat KALAYCI  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ  


## ÖNSÖZ

“*Phytolacca americana* (L.) Bitkisinin Biyoaktif Bileşenlerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilimsel olarak geniş bir bakış açısı kazanmamı sağlayan ve çalışmalarımın planlanmasından sonuçlanmasına kadar her aşamada yönlendiren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Emine AKYÜZ TURUMTAY’ a, her koşulda çalışmamıza destek verip yol gösteren hocam Doç. Dr. Cemal SANDALLI’ ya, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli hocalarım Dr. Emine KILIÇKAYA SELVİ ve Adem DEMİR’e bana destek ve yardımcı olan değerli arkadaşlarım Rahmi KURT, Şafak CAM, Havva ER, Melek CÜNİ, Kadir ŞAHİN’ e ve Kimya Bölümü ailesine teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca bana güvenip her türlü desteği sağlayan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hazırlanan bu yüksek lisans tezi TÜBİTAK tarafından 113Z054 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ümran KALKAN

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Phytolacca americana* (L.) Bitkisinin Biyoaktif Bileşenlerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.

07/05/2018



Ümran KALKAN

**Uyarı:** Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### *Phytolacca americana* (L.) BİTKİSİNİN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNİN HPLC-DAD İLE AYDINLATILMASI

Ümran KALKAN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Emine AKYÜZ TURUMTAY

*Phytolacca americana* (L.) Phytolaccaceae familyasına ait olup anavatanı Kuzey Amerika'dır. Bu tez çalışmasında bu meyvenin içerdiği biyoaktif bileşenlerin kromatografik olarak ayırımı ve belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla meyvelerin metanol ekstraktı hazırlandı. Bu ekstraktın kurutularak suyla çözülmesi ve sırasıyla dietil eter, etil asetat, bütanol çözücülerini ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulması ile geri kalan sulu kısım ile birlikte dört ekstrakt elde edildi. Metanol ekstraktına ayrıca bileşenlerin kompleks yapılarının parçalanıp daha basit yapılarının belirlenebilmesi için asidik hidroliz uygulandı. Asidik hidroliz sonucunda sulu kısım dietil eter ve etil asetatın ardışık kullanımıyla sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Bu organik kısımlar birleştirildi ve geride kalan sulu kısım ile iki farklı ekstrakt daha elde edildi. Metanol ekstraktı ve bu ekstraktan elde edilen altı ekstraktı tamamında mevcut fenolik bileşikler diyot serili detektör ile kombine yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-DAD) yöntemi ile aydınlatıldı. HPLC-DAD analizleriyle kantitatif olarak belirlenen fenolik bileşiklerin ekstraktlarda bulunma sırası etil asetat > bütanol > hidroliz organik > dietil eter > metanol > su ekstraktı şeklindedir. Ekstraktların içeriklerinde benzer bileşenler olmasına rağmen aynı bileşenlere az rastlanması nedeniyle ekstraktlar arasında farklılıklar gözlenmektedir. Genel olarak hem flavonoid hem de fenolik asit içerikleri zengindir. Ekstraktlarda fenolik asitlerden, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, ferulik asit ve şirincik asit ile birlikte *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, şirincik asit, *p*-kumarik asit, türevlerine rastlandı. Flavonoidlerden ise, rutin ve kuersetinin yanısıra, rutin, kuersetin, apigenin, luteolin ve kateşin türevleri gözlemlendi.

2018, 47 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Phytolacca americana*, fenolik bileşikler, HPLC-DAD.

## ABSTRACT

### ELUCIDATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF THE PLANT *Phytolacca americana* (L.) BY HPLC-DAD

Ümran KALKAN

Recep Tayyip Erdoğan University  
Graduated School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry  
Master Thesis

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

*Phytolacca americana* (L.) belongs to the family of Phytolaccaceae and its motherland is North America. In this thesis study, the chromatographic separation and determination of the bioactive components of the this fruit were aimed. For this purpose, the methanol extract of the fruits was prepared. This extract was dried and dissolved with water and subjected to liquid-liquid extraction with diethyl ether, ethyl acetate, butanol respectively, resulting in four extracts together with the remaining aqueous part. Acidic hydrolysis was applied to the methanol extract so that the complex structures of the components could be disrupted and simpler structures could be determined. As a result of acidic hydrolysis, the aqueous portion was subjected to liquid-liquid extraction by sequential use of diethyl ether and ethyl acetate. These organic fractions were combined and another two-part extract was obtained with the remaining aqueous fraction. The methanol extract the six extracts from this extract were illuminated by a high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) method combined with a diode-array detector. The order of the phenolic compounds quantitatively determined by HPLC-DAD analysis is ethyl acetate, butanol, hydrolysis organic, diethyl ether, methanol, water extract. Although there are similar components in the contents of the extracts, differences are observed between the extracts because they have rarely same components. In general, both flavonoid and phenolic acid contents of the extracts are rich. The extracts were found to contain *p*-OH benzoic acid, vanillic acid, citric acid, *p*-coumaric acid and derivatives, along with *p*-OH benzoic acid, vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid and syringic acid. Among the flavonoids, rutin, quercetin, apigenin, luteolin and catechin derivatives were observed as well as rutin and quercetin.

2018, 47 pages

**Keywords:** *Phytolacca americana*, phenolic compounds, HPLC-DAD.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Antioksidanlar.....	2
1.3. Fenolik Bileşikler.....	3
1.4. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.....	3
1.4.1. Flavonoidler.....	4
1.4.2. Flavanoller (Flavan-3-oller).....	5
1.4.3. Flavanonlar.....	5
1.4.4. Flavonoller.....	6
1.4.5. Flavonlar.....	6
1.4.6. İzoflavonlar.....	7
1.4.7. Fenolik Asitler.....	7
1.5. Betalainler.....	8
1.6. Ekstraksiyon.....	9
1.6.1. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerden Ekstraksiyonu.....	10
1.6.2. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu.....	11
1.7. Fenolik Bileşiklerin Analizleri.....	12
1.7.1. Spektrofotometrik Yöntemlerle Fenolik Bileşiklerin Tayini.....	12
1.7.2. DPPH• Serbest Radikal Temizleme ile Antioksidan Aktivite Belirleme.....	13
1.7.3. Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD ile Analizleri.....	14
1.8. <i>Phytolacca americana</i> L.....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Bitkilerin Toplanması.....	19

2.2.	<i>Phytolacca americana</i> L. Bitkisinin Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu.....	19
2.3.	<i>Phytolacca americana</i> L. Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri .....	20
2.3.1.	Kimyasal Malzeme ve Materyaller .....	20
2.3.2.	HPLC-DAD Analiz Koşulları .....	21
2.3.3.	Bitki Ekstraktlarında DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini .....	21
2.3.4.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini.....	22
3.	BULGULAR.....	23
3.1.	Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Metot Optimizasyonu.....	23
3.2.	Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri.....	24
3.3.	<i>P. americana</i> L. Bitkisinin Antioksidan Kapasitesi.....	34
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	36
5.	ÖNERİLER.....	41
	KAYNAKLAR .....	42
	ÖZGEÇMİŞ .....	47



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	4
Şekil 2. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	5
Şekil 3. Flavanollerin yapısı ve örnek bileşikler .....	5
Şekil 4. Flavanonların yapısı ve örnek bileşikler .....	6
Şekil 5. Flavonollerin yapısı ve örnek bileşikler .....	6
Şekil 6. Flavonların yapısı ve örnek bileşikler .....	7
Şekil 7. İzoflavonların yapısı ve örnek bileşikler .....	7
Şekil 8. Hidroksibenzoik asitlerin yapısı ve örnek bileşikler .....	8
Şekil 9. Hidroksisünamik asitlerin yapısı ve örnek bileşikler .....	8
Şekil 10. Betanidin, betanin ve betaksantin molekül yapıları .....	9
Şekil 11. DPPH• radikalının antioksidan bileşiklerle reaksiyonu .....	14
Şekil 12. HPLC-DAD cihazının şematik gösterimi.....	16
Şekil 13. <i>Phytolacca americana</i> L. bitkisinin Türkiye üzerindeki dağılımı .....	17
Şekil 14. <i>Phytolacca americana</i> L. bitkisinin iki gelişim evresi.....	17
Şekil 15. <i>P. americana</i> metanol ekstraktının eter, etilasetat, bütanol, sulu ve asidik hidroliz organik ekstraktları.....	20
Şekil 16. Optimize edilen HPLC-DAD metodu kullanılarak 5 mg/L derişimde 20 standart fenolik bileşimin 254, 280, 315 ve 370 nm' deki kromatogramları ....	23
Şekil 17. Betalain olarak karakterize edilen piklere ait UV spektrumları .....	28
Şekil 18. <i>P. americana</i> metanol ekstraktının 280 nm' de HPLC-DAD kromatogramı..	29
Şekil 19. Rutin türevlerinin UV spektrumu.....	30
Şekil 20. <i>P. americana</i> bütanol ekstraktının 370 nm' de HPLC-DAD kromatogramı...	30
Şekil 21. <i>P. americana</i> su ekstraktının 280 nm' de HPLC-DAD kromatogramı .....	31
Şekil 22. <i>P. americana</i> su ekstraktının 254 nm' de HPLC-DAD kromatogramı .....	32
Şekil 23. <i>P. americana</i> hidroliz organik ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı .....	32
Şekil 24. <i>P. americana</i> eter ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (280 nm).....	33
Şekil 25. <i>P. americana</i> etilasetat ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (280 nm)....	33
Şekil 26. Kateşin türevinin UV spektrumu.....	34
Şekil 27. Apigenin (A) ve apigenin türevlerinin (B) UV spektrumu .....	37
Şekil 28. Glikozidik betalain (betanin) yapısı .....	39

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> DPPH radikal temizleme aktivitesi yöntemi için deney şartları .....	22
<b>Tablo 2.</b> Toplam fenolik madde tayininin uygulama aşamaları.....	22
<b>Tablo 3.</b> Geliştirilen HPLC-DAD metodunun validasyon parametreleri.....	24
<b>Tablo 4.</b> Geliştirilen HPLC-DAD metodunun kalibrasyon parametreleri .....	25
<b>Tablo 5.</b> HPLC-DAD ile ekstraktlarda belirlenen fenolik madde miktarı .....	27
<b>Tablo 6.</b> <i>P. americana</i> L. meyve ekstraktlarının antioksidan kapasitesi .....	35



## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

vd.	Ve Diğerleri
C18	Oktadesil
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC- DAD	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diyot Dizisi Dedektörü
LOD	Tespit Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Sınırı (Limit of Quantitation)
M	Molarite
nm	Nanometre
UV	Ultraviöle
EPA	U. S. Environmental Protection Agency
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Besinlerin tedavi edici yeteneklerinin olabileceği kavramı yeni değildir. Yaklaşık olarak 2500 yıl önce tıbbın babası sayılan Hipokrat “Besinler ilacınız, ilacınız besininiz olsun” demiştir (Hasler, 2002). Besinlerin ilaç gibi davranabileceği ve fonksiyonel besin kavramı ilk önce uzak doğu ülkelerinde doğmuş ve besinlerin sağlık üzerindeki etkileri uzun yıllar araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Kwak ve Jukes, 2001).

Vücutta meydana gelen oksidasyon, serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Serbest radikaller ise, son derece reaktif maddeler olup, birçok farklı molekül ile kolay bir şekilde tepkimeye girebilmektedirler. Bu tepkime sonucu da, sağlıklı hücreler ve DNA yapıları zarar görmektedir. İşte tam bu noktada devreye giren antioksidanlar, serbest radikaller ile tepkimeye girerek, onların hücrelere zarar vermesini önlemektedirler.

Bitkilerden antioksidanların eldesi ve saflaştırılmaları bu bileşenlere kaynak oluşturma açısından önemlidir. Bitki özütlerindeki antioksidanların, kromatografik olarak ayrımları ve tanımlanması için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) etkin şekilde kullanılmaktadır.

Şekerci boyası olarak da bilinen *Phytolacca americana* L. Phytolaccaceae familyasına ait çok yıllık bir ot yapısındadır. Meyvelerinin canlı mor renklerinden dolayı kimyasal renk sabitleştiricileriyle birlikte iplik endüstrisinde kullanımının uygun olduğu rapor edilmiştir (Su-Youn ve Su-Youn, 2014).

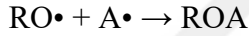
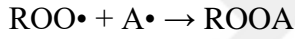
Bu tez çalışması *P. americana* L. bitkisinin meyve kısmının fenolik bileşenlerinin HPLC-DAD yöntemi ile aydınlatılması üzerine yapılmıştır. HPLC-DAD yöntemi ile fenolik bileşiklerin analizleri için uygun koşullar sağlanmıştır. Bu koşullar altında kademeli şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen fenolik bileşiklerin analizleri gerçekleştirilmiştir.

## 1.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir (Halliwell vd., 1995).

Antioksidanlar, hücrelere zarar veren prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek az zararlı veya zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır (Cao ve Prior, 1999).

Antioksidan radikaller, peroksi, oksi ve diğer antioksidan radikaller ile sonlandırma reaksiyonlarına katılabilme yeteneğine sahiptirler.



(A: Antioksidan molekülü, A• : Antioksidan etkin molekülü, ROO: Radikal molekülü)

Antioksidanlar hücrelere zarar veren türlerin reaksiyonlarını inhibe ederek toksik olmayan ürünler oluşturmaktadır. Örneğin; yağların oksidasyonunu önlemeyi veya yavaşlatmayı sağlarlar. Antioksidan takviyesi ve antioksidanca zengin bir beslenme ile serbest radikallerin ve aktif oksijenin meydana getirdiği oksidatif hasar engellenebilmektedir.

Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda, antioksidan yapıların etki mekanizmaları ile birçok hastalığı önleyebildiği belirlenmiştir. Son zamanlarda araştırmacılar doğal antioksidan olarak değerlendirebileceğimiz, bitkilerde bulunan polifenoller ve flavonoidlere daha çok ilgi göstermektedirler (Frankel ve Finley, 2008; Moon ve Shibamoto, 2009).

### **1.3. Fenolik Bileşikler**

Fenolik bileşikler bitkilerde doğal olarak oluşan maddelerdir. Bir veya daha fazla aromatik benzen halkaları ile bir veya daha fazla hidroksil gruplarının (-OH) bir araya gelmesiyle oluşurlar. Metil, metoksil, amino grup veya glikosil gruplarıyla farklılaşabilirler (Beckman, 2000). Fenolik bileşikler asidiktir ve kolay parçalanabilirler.

Fenolik bileşikler bitkileri ultraviyole ışınlarından, hastalık ve zararlılardan korurlar (Braun ve Tevini, 1993). Fenolik bileşiklerin, bitkileri fungal, bakteriyel etmenlere ve abiotik stres faktörlerine karşı koruyabildiklerini belirtmişlerdir. Renk ve aromaya katkıda bulunurlar ve aynı zamanda büyümeye ve çoğalmaya yardım ederler (Frank, 2004).

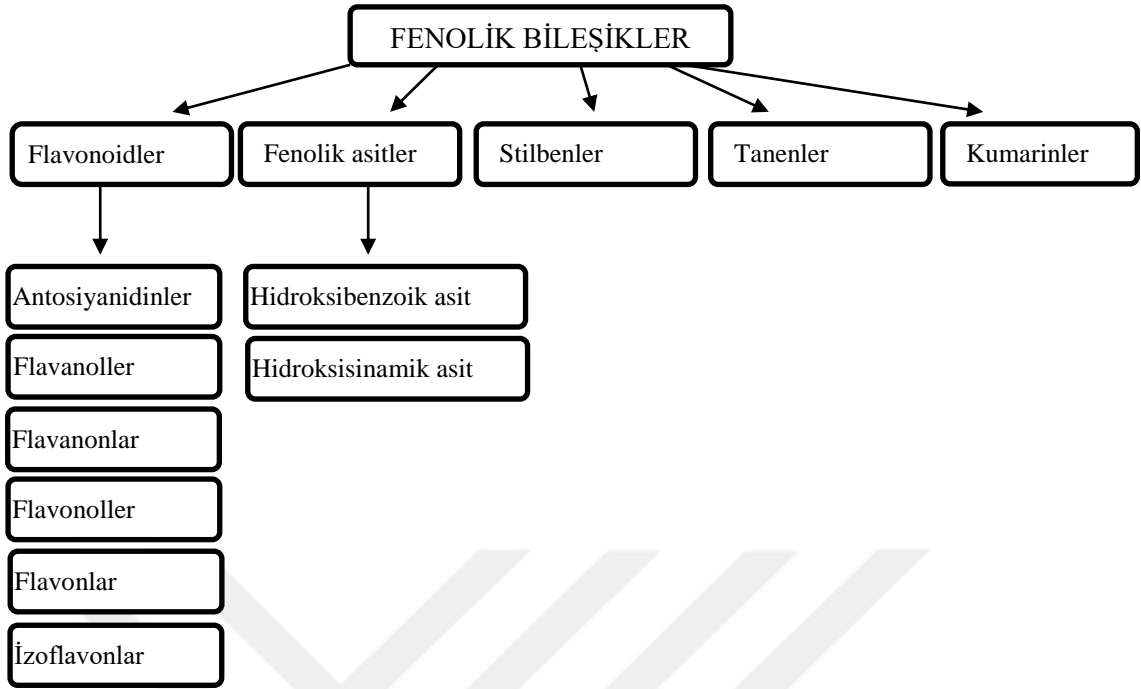
Gallik, klorojenik, kafeik, ellacik ve ferulik asitler gibi meyvelerdeki fenolik asitler antimutajenik antioksidan, anti kanserojen ve anti tümör etkiye sahiptirler (Namiki vd., 1993; Rice-Evans vd., 1996; Arimoto-Kobayashi vd., 1999).

Bitki fenolik bileşiklerinin farklı kromatografik teknikler ile analizi sayesinde çeşitli türlerde tanımlama ve taksonomik amaçlı araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Erdman, 2007).

### **1.4. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması**

Fenolik bileşiklerin kimyasal olarak incelenmesinde farklı sınıflandırmalar kullanılabilir. Fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılan polifenolik bileşikler, odunsu doku dışındaki bitki organlarının tümünde yer alırlar (Poyrazoğlu vd., 2002). Fenolik asitlerin karboksil grupları; karbonhidratlar, glikozitler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterleri, amino bileşikleri ile de amidleri oluştururlar (Acar, 1998).

Bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidlere olarak iki gruba ayrılırlar (Cemeroğlu, 2004).

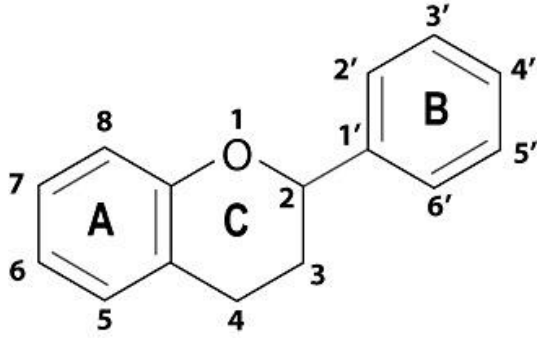


**Şekil 1.** Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Bu tez çalışması kapsamında fenolik asitler ve flavonoidler incelendiği için detaylı olarak bu bileşikler üzerinde duruldu.

#### 1.4.1. Flavonoidler

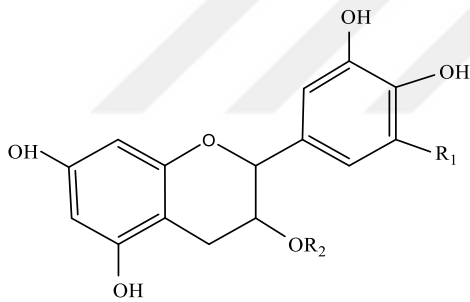
Flavonoidler; önemli antioksidan ve şelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Heim vd., 2002).



Şekil 2. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

#### 1.4.2. Flavanoller (Flavan-3-oller)

Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluşturan, hemen hemen her meyvede bulunan kateşinler renksiz bileşiklerdir. Kateşinler, C<sub>3</sub> atomunda bir -OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar (Aron ve Kennedy, 2008).



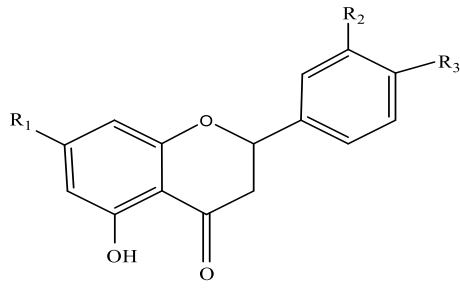
Flavan-3-oller	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Kateşin	H	H
Epikateşin	H	H
EGC	OH	H
ECG	H	Gallat
EGCG	OH	Gallat

Şekil 3. Flavanollerin yapısı ve örnek bileşikler

#### 1.4.3. Flavanonlar

Flavonun dihidroksi türevi flavanondur. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetindir. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringenin glikoziti olan naringindir. Hesperidin ve hesperetin limon ve portakalda bolca bulunur. Hesperidin, hesperetin glikozitidir (Rice-evans vd., 1995).



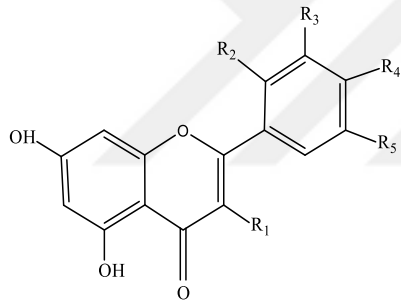


Flavanonlar	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Naringenin	OH	H	OH
Eriodiktiol	OH	OH	OH
Hesperidin	7-O-Rha-glu	OH	OCH <sub>3</sub>
Hesperetin	OH	OH	OCH <sub>3</sub>

**Şekil 4.** Flavanonların yapısı ve örnek bileşikler

#### 1.4.4. Flavonoller

En önemli flavonoller kuersetin, mirisetin, fisetin ve kamferoldur. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Soğanda, elmada ve lahanada bol miktarda bulunur (Rice-evans vd., 1996).

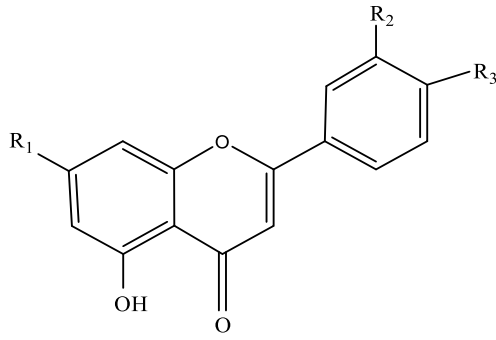


Flavonoller	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Rutin	3-O-Rha-glu	H	OH	OH	H
Kamferol	OH	H	H	OH	H
Kuersetin	OH	H	OH	OH	H
Mirisetin	OH	H	OH	OH	OH
Fisetin	OH	H	H	OH	OH

**Şekil 5.** Flavonollerin yapısı ve örnek bileşikler

#### 1.4.5. Flavonlar

Flavon sınıfına ait temel bileşikler apigenin, luteolin ve krisindir. Maydanoz, kekik, kereviz, acı biberin yapısında bulunur (Peterson, 1998).

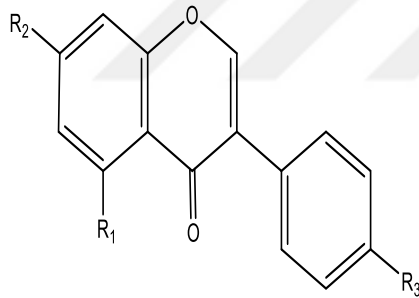


Flavonlar	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Luteolin	OH	OH	OH
Apigenin	OH	H	OH
Krisin	OH	H	H
Genkvanin	OCH <sub>3</sub>	H	OH

**Şekil 6.** Flavonların yapısı ve örnek bileşikler

#### 1.4.6. İzoflavonlar

İzoflavonlar en çok soya fasulyesinde olmak üzere çeşitli kuru baklagillerde bulunur. İzoflavonlar arasında, daidzein, genistein ve glisitein ön plana çıkmaktadır (Büyüktuncer ve Başaran, 2005).

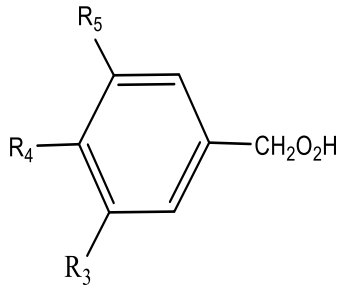


İzoflavonlar	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Genistin	OH	7-O-Glu	OCH <sub>3</sub>
Daidzein	H	OH	OH
Genistein	OH	OH	OH
Ononin	H	7-O-Glu	OCH <sub>3</sub>

**Şekil 7.** İzoflavonların yapısı ve örnek bileşikler

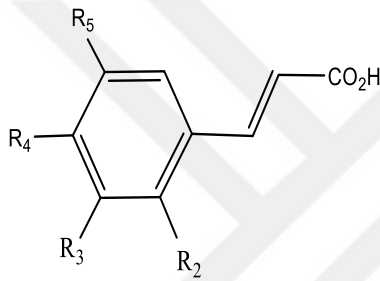
#### 1.4.7. Fenolik Asitler

Genel olarak serbest halde bulunmayan fenolik asitler; hidroksi benzoik asitler ve hidroksi sinamik asitler olmak üzere iki grupta incelenirler. Bu bileşiklere OH ve OCH<sub>3</sub> grupları bağlanarak önemli fenolik asit türevleri oluşmaktadır (Yıldız ve Baysal, 2003).



<b>Hidroksibenzoik Asitler</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
<i>p</i> -OH benzoik asit	H	OH	H	H
Protokatekuik asit	H	OH	OH	H
Vanilik asit	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Şirincik asit	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Gallik asit	OH	OH	OH	H
Salisilik asit	H	H	H	OH

**Şekil 8.** Hidroksibenzoik asitlerin yapısı ve örnek bileşikler



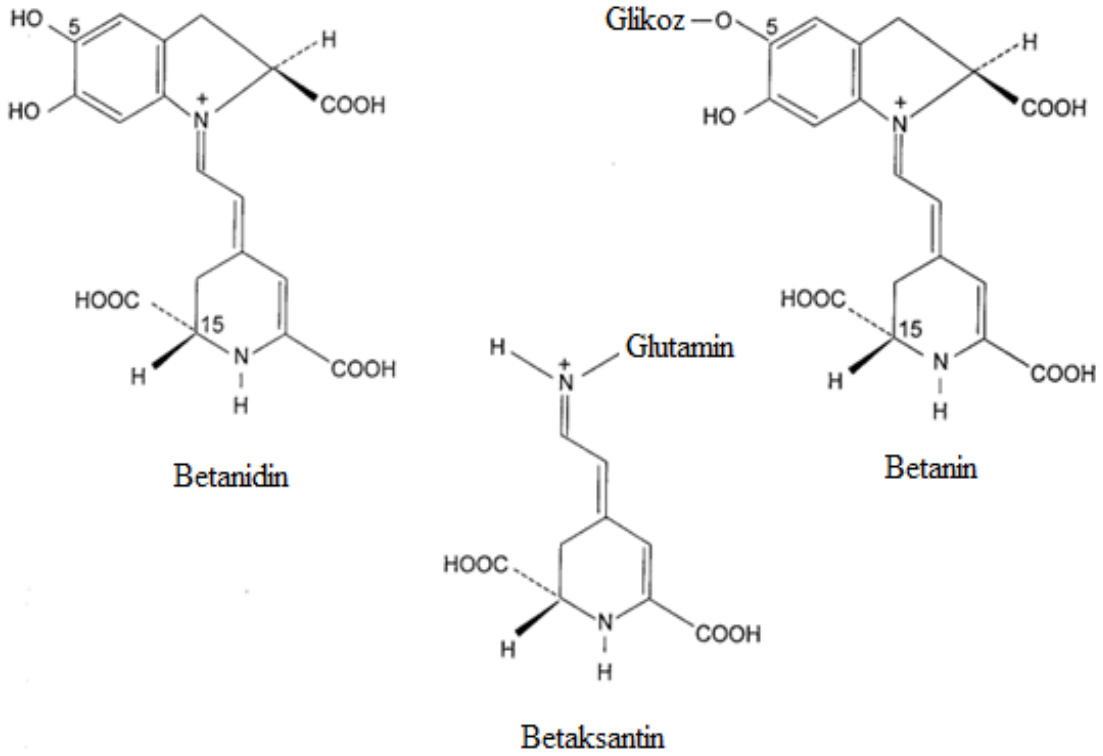
<b>Hidroksisinasamik Asitler</b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>
<i>o</i> -kumarik asit	OH	H	H	H
<i>p</i> -kumarik asit	H	H	OH	H
Kafeik asit	H	OH	OH	H
Ferulik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Sinapik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

**Şekil 9.** Hidroksisinasamik asitlerin yapısı ve örnek bileşikler

### 1.5. Betalainler

Betalainler ilk kullanılan ve en önemli doğal renklendiricilerdendir. Antioksidan özellikleri ortaya konuldukça biyoaktif bileşenler olarak ilgi çekmeye başladılar. Ancak bu bileşiklerin karotenoid ve antosiyaninler gibi diğer doğal renklendiricilerle karşılaştırıldığında sağlık üzerine etkileri hakkında çok az bilgi mevcuttur. Son yıllarda Amaranthaceae familyasından *Beta vulgaris*, Cactaceae familyasından *Lepismium lorentzianum*, *Lepismium lumbricoides* ve *Opuntia ficus indica* gibi türlerde mevcut betalainlerin antioksidan özellikleri incelenmiş ve güçlü antioksidan etkileri rapor edilmiştir (Daniela vd., 2002; Cai vd., 2003; Zampini vd., 2011). Doğada Centrospermeae familyasında yer alan, kırmızı pancar gibi bitkilerde, bazı mantarlarda, bugonvil gibi çiçeklere rengini veren bileşiklerdir.

Betalainler, kırmızı viole renkli betacyanin ve sarı turuncu renkli betaxantinler olarak iki gruba ayrılırlar. Betanin, betacyanin grubunda yer alır ve betanidinin glikozidik yapısıdır (Şekil 10). Hidroliz sonucunda betanin, betanidin ve şeker gruplarına parçalanır. İyonik yapıları ve iyonlaşabilen karboksilik grupları ve hatta betanin molekülündeki gibi yapılarında bulunan şeker grupları sayesinde suda çözünürler. Saf haldeki betalainler, pH 4-6 arasında kararlı iken, en iyi renk yoğunluğu pH 5'te gözlenmektedir.



Şekil 10. Betanidin, betanin ve betaxantin molekül yapıları

## 1.6. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, çözeltilerden veya katı karışımlardan bir maddeyi, grubu veya istenmeyen safsızlıkları ayırmak için uygulanan bir işlemdir. Ekstraksiyon işleminde çözücü seçimi, sıcaklık, parçacık boyutu ve ekstraksiyon süresi en önemli parametrelerdendir.

Ekstraksiyonda kullanılacak çözücülerde olması gereken özellikler şöyle sıralanabilir:

- ✓ Ekstrakte edilecek bileşenler için seçici olması,
- ✓ Doygunluk derişiminin yüksek olması,
- ✓ Viskozitenin ve yüzey geriliminin düşük olması,
- ✓ Kaynama noktasının düşük, donma noktasının 0°C'nin altında olması,
- ✓ Yoğunluğunun düşük olması,
- ✓ Enerji tasarrufu açısından spesifik ısısının düşük olması,
- ✓ Korozif, toksik ve patlayıcı olmaması,
- ✓ Taşınması, depolanması ve kullanılması kolay olmalıdır.

Su, yukarıdaki özellikleri sağlayan ve en çok kullanılan çözücü olmakla birlikte, bazı bitkisel hammaddeler için etilalkol, aseton, petrol eteri, hekzan, kloroform gibi organik çözücüler de sıkça kullanılır.

#### **1.6.1. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerden Ekstraksiyonu**

Yapılan kantitatif analizler için, öncelikle fenolik maddelerin örnekten ekstrakte edilmeleri gerekmektedir. Ekstraksiyonunda kullanılacak olan yöntem, ekstrakte edilmek istenen fenolik bileşiğin çeşidine göre değişmektedir. Bitkilerden fenolik maddelerin ekstraksiyonu suyla, asit ya da tuzların sulu çözeltileriyle, etanol, metanol ve bunların su ile çeşitli oranlarda karışımlarının oluşturduğu çözeltilerle, aseton, n-bütanol, dietil eter, etil asetat çözeltileri ya da dimetil sülfoksit gibi polar çözücüler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Kallithraka vd., 1995). Ayrıca ekstrakt, jel kromatografi ya da katı-faz ekstraksiyonu kullanılarak saflaştırılabilmektedir.

Sıcaklık arttıkça ekstraksiyon verimi genellikle artar. Sıcaklığın artışı, ekstrakte edilecek madde ve çözücünün viskozitesini azaltıcı etkisinin yanında çözünürlüğün artmasına neden olur. Herhangi bir ekstraksiyon ortam sıcaklığının, kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığına bağımlı bir üst sınırı bulunmaktadır. Çünkü ekstraksiyon ortamının sıcaklığı, çözücünün kaynama sıcaklığına yaklaştıkça çözücü buharlaşması artacağından ekstraksiyon için yararlı çözücü miktarı azalır. Bunun için uygulamada ekstraksiyon ortamının sıcaklığı kullanılan çözücünün kaynama

sıcaklığından 10–12°C daha düşük tutulur. Ayrıca fenolik bileşiklerin doğal yapılarını korumaları açısından da sıcaklığın gereğinden yüksek olmamasına dikkat edilir.

Çözeltilerden ayrışması istenen madde veya grubun çözücü yardımı ile alınması sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı materyalden herhangi bir madde veya grubun uygun bir çözücü kullanılarak ayrılması ise katı-sıvı ekstraksiyonu olarak adlandırılır. Fenolik bileşiklerin bitkilerden ekstraksiyonu için hem sıvı-sıvı hem de katı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandığından bu yöntem detaylı incelendi.

### **1.6.2. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu**

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, karışmayan iki sıvıda çözünen bir maddenin bu iki fazdaki konsantrasyonları oranının belli bir sıcaklıkta sabit olması şeklinde tanımlanan dağılma kanunu temeline dayanır. Sıvı faz içindeki bir madde bu maddeyi daha çok çözen ve ilk sıvı ile hiç karışmayan ikinci bir sıvı kullanılarak çekilir. Örneğin suda çözülmüş olan bir organik madde daha çok çözünebileceği ve su ile karışmayan eter ya da kloroform gibi organik sıvılarla ekstrakte edilir.

Fenolik bileşiklerin sıvı-sıvı ekstraksiyonunda en yaygın olarak kullanılan ikiorganik çözücü dietil eter ve etil asetat (Termentzi vd., 2006). Bu çözücüler çoğu zaman polimerleşmiş ya da glikozitleri halinde bulunan fenolik bileşiklerin hidrolizlenerek serbest fenolik bileşikler halinde ekstrakte edilmelerinde kullanılmaktadır (Naczki ve Shahidi, 2006). Bazı durumlarda ham ekstrakttan fenolik bileşikleri doğal formlarında ve polarite değişimlerine göre fraksiyonlayarak izole etmek daha iyi bir çözümdür. Bunun için sulu çözeltideki bileşenler hekzan, kloroform ya da diklorometan gibi apolar bir çözücü ile başlayarak sırasıyla dietil eter, etil asetat, n-bütanol ile ardışık olarak ekstrakte edilerek fraksiyonlarına ayrılabilirler (Termentzi vd., 2006). Bu tez kapsamında metanol ile elde edilen ham ekstraktlar sırasıyla dietil eter, etil asetat, n-bütanol ile ardışık olarak fraksiyonlarına ayrıldı ve her bir ekstrakt HPLC-DAD ile analiz edildi.

## **1.7. Fenolik Bileşiklerin Analizleri**

Fenolik bileşiklerin analizleri genel olarak spektrofotometrik ve kromatografik olarak iki yöntemle yapılmaktadır. Spektrofotometrik yöntemler, fenolik bileşiklerin etkileştirildikleri reaktifler ile oluşturdukları renkli bileşiklerin renk yoğunluğunun spektrofotometre ile ölçülmesi esasına dayanır. Bu yöntemler, genel olarak fenolik yapıların verdiği reaksiyon ürünleri ölçüldüğü için toplam fenolik madde tayini olarak kullanılmaktadırlar. Kromatografik analizlerde ise bitki ekstraktlarındaki fenolik bileşikler öncelikle kromatografik bir ayırma tabi tutulurlar ve ayrı ayrı dedekte edilirler. Sıcaklıkla bozulabilen ve kaynama noktaları yüksek olan fenolik bileşikler için sıvı kromatografisi kullanılmaktadır. Kromatografik çalışmalar ile bitki dokularında yaygın olarak bulunan ve kararlı bir yapıya sahip olan fenolik bileşiklerin tanımlanabilmesi mümkün olmaktadır.

Bu tez kapsamında da bitki ekstraktlarındaki antioksidan bileşiklerin analizleri spektrofotometrik olarak ve HPLC-DAD ile gerçekleştirilmiştir ve bu konuya detaylı olarak değinilecektir.

### **1.7.1. Spektrofotometrik Yöntemlerle Fenolik Bileşiklerin Tayini**

Genel olarak, fenolik bileşiklerin tayini ayırıştırma, saflaştırma ve miktar tayini olarak üç temel aşamadan oluşur. Fenolik bileşikleri analiz etmek için spektrofotometrik (kolorimetrik reaksiyonlar), HPLC, gaz kromatografisi (GC), enzimatik esaslı ve biyosensörlere dayalı yöntemler başta olmak üzere birçok yöntem kullanılmaktadır (Gomez-Caravaca vd., 2006).

Özellikle fenolik bileşikler arasında büyük kimyasal çeşitlilik nedeniyle, numunelerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için çeşitli testler geliştirilmiştir. Bu testler, reaksiyon mekanizması, hedef türler, reaksiyon koşulları ve sonuçların nasıl ifade edildiği bakımından farklıdır. Antioksidan kapasitesini değerlendirme yöntemlerinin çeşitliliğine rağmen, evrensel bir yöntem yoktur. Bu gerçek, antioksidan

kapasitesinin farklı testler, farklı temel ve etki mekanizmaları ile değerlendirilmesi gereğini getirir (Huang vd., 2005; Niki ve Noguchi, 2000).

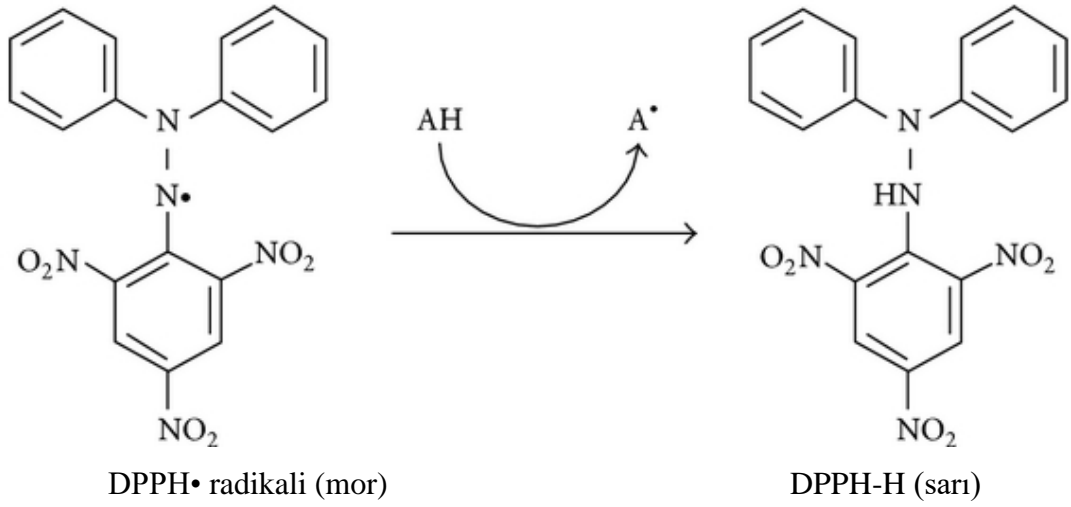
### **1.7.2. DPPH• Serbest Radikal Temizleme ile Antioksidan Aktivite Belirleme**

DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir. 516 nm dalga boyunda absorpsiyon veren koyu menekşe renktedir. Bu yöntem DPPH radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır (Prior vd., 2005). Basit ve hızlı olması, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, çok sayıda örnek analizi mikropilaka kullanılarak yapılabilir olması bu yöntemi avantajlı kılmaktadır (Perez-Jimenez vd., 2008).

DPPH• suda çözünürlüğünün düşük olması, suda çözünen antioksidanların tespiti için bir sınırlamaya sebep olsa da fenolik bileşiklerce zengin doğal ürünlerin antioksidan kapasitesini ölçmek ve karşılaştırmak için geniş ölçüde kullanılmaktadır. Radikalın uzun süre ışık ile etkileşiminin renginde açılmaya sebep olduğu, metanol ve aseton ile hazırlanmış çözeltilisinin 517 nm'deki absorbansının ışık altında, 120 dakikalık süre boyunca %20 ve %35 azalışı ile tespit edildiği için bu yöntemde bekletme karanlıkta yapılmalıdır. Karanlıkta ise 150 dakika boyunca önemli bir değişim olmadığı bulunmuştur (Özcelik vd., 2003).

Bir antioksidan ya da radikal (R•) türün etkisiyle, DPPH, sarı renkli 2,2-difenilpikrilhidrazin (DPPH-H) formuna indirgenir (Şekil 11). Renk değişimi ile absorpsiyon bandının kaybolması absorbansın düşünün izlenmesiyle tespit edilir. Bu durumda mor rengin şiddetindeki azalma antioksidan maddenin radikal temizleme aktivitesinin hesaplanmasında kullanılır (Huang vd., 2005). Antioksidanlar ilereaksiyona giren DPPH• radikalinin 517 nm'deki absorbans değişimi ölçülüp, değişen antioksidan derişimlerine karşı absorbans şiddeti grafiğe geçirilir. Elde edilen grafiğin denklemi kullanılarak DPPH• radikalinin maksimum absorbansını yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonu, yani radikal temizleme kapasitesi (SC<sub>50</sub>) hesaplanır.





**Şekil 11.** DPPH• radikalinin antioksidan bileşiklerle reaksiyonu

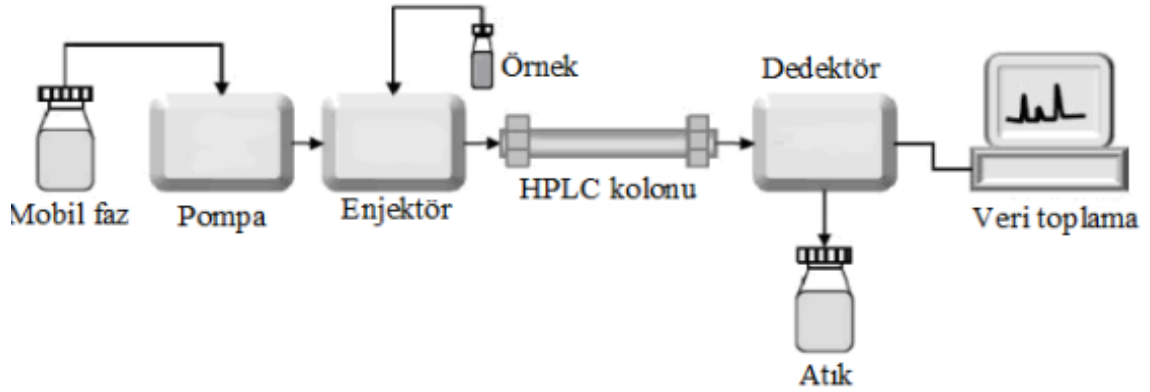
### 1.7.3. Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD ile Analizleri

Doğada, aromatik halkalarının yapısal farklılıklarına, OH gruplarının sayısına ve yerine, karbonhidratlarla ve organik asitlerle yapmış oldukları bağlara bağlı olarak 30.000'den fazla fenolik bileşik bulunmaktadır. Bunlardan 5.000-10.000 kadarının günlük diyetimizde yer aldığı düşünülmektedir. Fenolik bileşikler antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik etkiye sahip olmaları nedeniyle insan sağlığı açısından önemli bileşiklerdir. Bu bileşiklerin yapısal olarak birbirlerine çok benzer olmaları nedeniyle tek tek izolasyonları ve analizleri zaman alıcı olduğundan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği ile ayırımları kısa zamanda daha etkin olarak gerçekleştirilir. HPLC, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının başlıca sebepleri, duyarlılığı, doğru nicel tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, otomasyon kolaylığı, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden önemlisi endüstriyi, birçok bilim dalını ve halkı yakından ilgilendiren maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Fenolik bileşiklerin HPLC analizlerinde, çoğunlukla ters-faz sıvı kromatografisi kullanılmakla birlikte, fenolik asitler için iyon-değiştirme kromatografisi de kullanılmaktadır. Ters-faz sıvı kromatografisi kullanıldığında sabit faz olarak çoğunlukla C18 kolon, mobil faz olarak da su ya da formik asit, asetik asit gibi

bileşiklerin sulu çözeltileri ile birlikte asetonitril, metanol, isopropil alkol, tetrahidrofuran gibi organik çözücüler kullanılmaktadır (Skoog vd., 2007). Bileşenler hakkında ayırt edici başka bilgilerin elde edilmesi için HPLC sistemine bağlı olarak UV vis absorpsiyonuna dayanan Fotodiyot serili dedektör (DAD), floresans dedektörü ve kütle dedektörü (MS) gibi dedektörler geliştirilmiştir. HPLC analizlerinde yaygın olarak UV dedektörler kullanılır. Fotodiyot dizi dedektörün, tüm dalga boylarını aynı anda ölçmesi, sinyal/gürültü oranının yüksek olması, analizin hızlı gerçekleşmesi (~ 1 sn) ve hareketli parçasının olmaması nedeniyle daha sağlam olması gibi üstünlükleri vardır (Harris, 2007).

Tez kapsamında fotodiyot dizili dedektör kullanıldı. Bu dedektörün UV dedektörüne göre üstünlüğü, tasarımındaki farklılık sayesinde analizlerde eş zamanlı olarak örnekteki UV vis absorpsiyonuna sahip bileşenlerin UV vis spektrumlarının da elde edilebilmesidir.

HPLC sistemi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Bu sistemin önemli bir bölümü ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Düzgün iç çaplı paslanmaz çelikten oluşan kolonlar kullanılır. Kolonların çoğu cm uzunluğundadır ve düzdür. İç çapları homojen olup, 4-10 mm kalınlığındadır. Gözenekli kolon dolgu malzemelerinin (polimer, alümina, sentetik reçine gibi) mikrotanecik boyutu 3-10 µm arasındadır. En yaygın dolgu maddesi silisyum dioksittir. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamının kolonda alıkonma zamanlarına karşılık çizildiği grafiklere kromatogram adı verilir. Analizler bu kromatogramların yorumlanması sonucu gerçekleştirilir (URL-2, 2018).

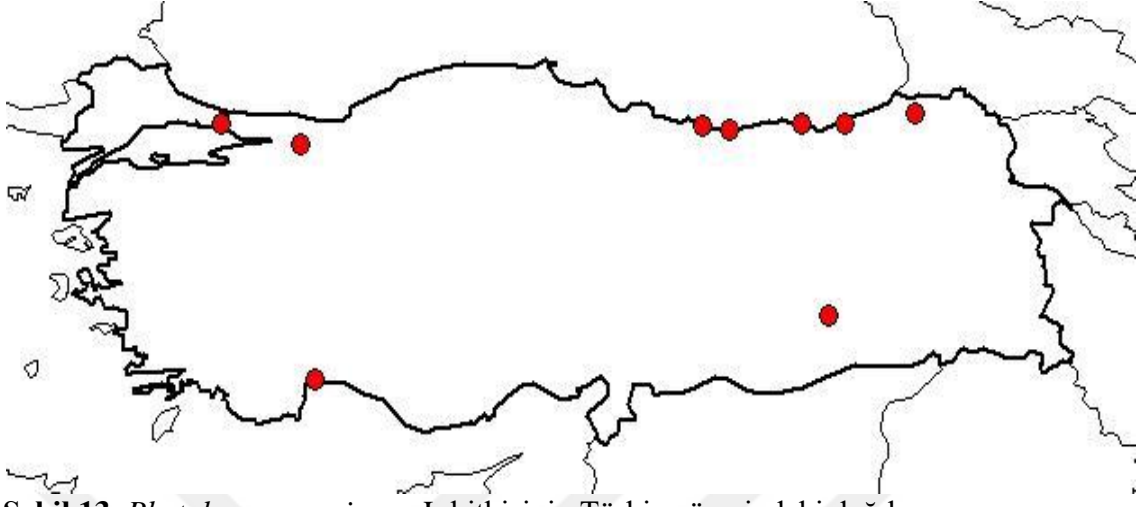


Şekil 12. HPLC-DAD cihazının şematik gösterimi.

### 1.8. *Phytolacca americana* L.

*Phytolacca americana* L. bitkisi Phytolaccaceae familyasına ait bir bitki türüdür. Bitkinin botanik adı şekerçi boyası olup genelde 1-3 metre boyunda ve dalları 1-2 metre çapında yayılabilen otsu bitkidir. Çok yıllık, herdem yeşil bir bitki olup dikine gelişir. Anavatanı Kuzey Amerika'dır. Türkiye'de de egzotik olarak yetiştirilebilir. Çiçekleri Mayıs ayında açmaya başlar ve Ekim ayına kadar (4-5 ay) çiçekli kalabilir. Çiçekleri gövde veya dalların tepesinde silindirik şeklinde bir arada bulunur. Önce pembemsi beyaz sonra yeşildir. Sonrada olgunlaşan meyveleri koyu mor renklidir. Genel olarak *Phytolacca* cinsi; Kuzey ve Kuzey Doğu Anadolu'dan Ermenistan'a kadar, Rize Verçenik Yaylası 2800 m rakımlarında, Artvin Şevval Tepe'nin yukarılarında, Kafkasya ve Karadeniz dağlarının çevrelerinde sıkça görülmektedir. Ülkemizdeki yayılışı Şekil 13'de görülmektedir.

İstanbul, Antalya, Artvin, Diyarbakır, Giresun, Ordu, Rize, Sakarya, Trabzon illerindedir (URL-3, 2018).



Şekil 13. *Phytolacca americana* L. bitkisinin Türkiye üzerindeki dağılımı

Meyveleri önce yeşil sonra parlak siyaha yakın koyu mor bir şekil alır ve 1cm çapındadır. Gövdesi yuvarlak ve içi boştur. Gövde ve sürgünler gençken yeşil sonra kırmızı renktedir. Zehirli bir bitkidir (Şekil 14).

Ding vd. (2013)' te yaptıkları çalışmada bitkinin yaprak, sap ve kök ekstraktlarının zengin saponin içeriklerinden dolayı pamuk kırmızı örümceği deneni *Tetranychus Cinnabarinus*'u öldürücü etkisi olduğunu belirlediler.



Şekil 14. *Phytolacca americana* L. bitkisinin iki gelişim evresi

Tıbbi bir bitki olup, saponin, rezin ve şeker içerir. Müshil ilaçları yapımında, ayrıca kozmetik ve boya sanayinde kullanılır. Reçel, şarap ve jel yapımında da kullanılır. Daha çok kırsal peyzajda sınır ögesi olarak kullanılır.

Çin tıbbında kurutulmuş kökleri tümörler, bronşit ve iltihaplanma tedavisinde bitkisel ilaç olarak kullanılır (Wang vd., 2008). Ancak, yüksek dozlarda ve uzun süreli tedavide organizmaya toksik etki verebilir. Kökler ağrı, huzursuzluk, bitkinlik tedavisinde kullanılabilir (Maness vd., 2014).

Bu bitkinin kökleri çeşitli virüsleri engelleyebilen antiviral özelliklere sahip olan bir protein içerir. İnsanlarda enfeksiyonlardan sorumlu herpes simpleks virüsü (HSV) olan virüsün çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir (Ryan ve Ray, 2004; Teltow vd., 1983).

Joy vd. (1995)' te yaptıkları çalışmada *P. americana* bitkisinin meyve kısmında betasiyaninler karakterize edilmiştir. Meyvelerde betanin -6'-O-sülfat yapısı ana bileşen olarak ortaya çıkmıştır.

Bu tez çalışmasında *Phytolacca americana* L. bitki ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerinin aydınlatılması hedeflendi. Bitkilerde en yaygın olarak bulunan antioksidan bileşikler olan fenolik bileşikler spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini ile toplam olarak ve HPLC-DAD yöntemi ile de ayrı ayrı tespit edildi. Fenolik asitler ve flavonoidlerden oluşan 20 standart fenolik bileşik kullanılarak geliştirilen HPLC-DAD yöntemi kullanıldı. Kromatografik ayırma öncesinde uygun ekstraksiyon yöntemleri seçilerek bitki bileşenleri çeşitli ekstraktlarına ayrıldı. Böylece daha keskin pikler elde edilerek ayırım güçlendirildi.

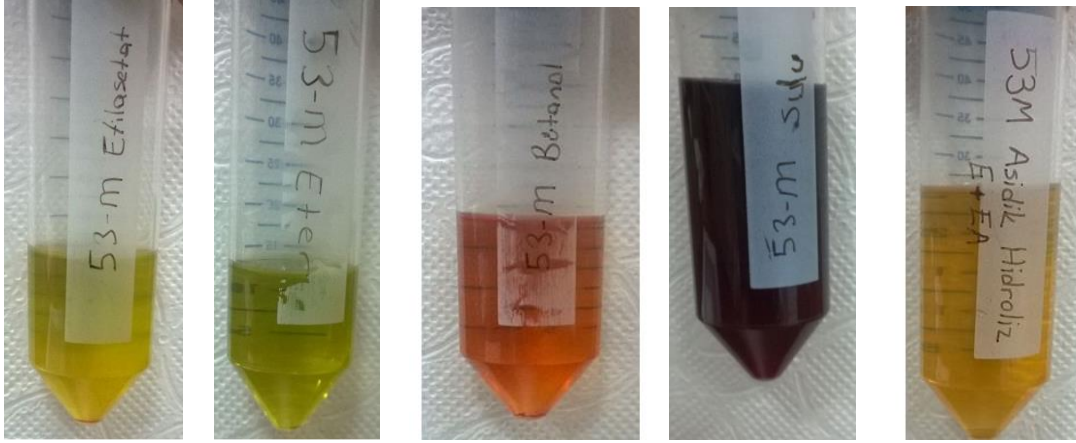
## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Bitkilerin Toplanması

Deneylerde kullanılan *Phytolacca americana* L. bitkisine ait örnekler, Temmuz 2015'te Rize Verçenik Yaylası 2800 m rakımlarında toplandı. Taze örnek ekstraksiyona kadar -20°C' de saklandı. Bitkinin meyveleri sap kısmından ayrılarak yüzey alanının genişletilmesi amacıyla öğütme makinesinden geçirildi. Öğütülen bitki örneklerinin bir miktarı etüvde 100 °C' de 5 saat bekletilerek ihtiva ettikleri nem miktarı % 11, 73 olarak belirlendi.

### 2.2. *Phytolacca americana* L. Bitkisinin Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Öğütülen taze meyve örneklerinden 5g tartılarak 20 mL metanol ile 27 °C'de 2 saat çalkalayıcıda ekstrakte edildi. Sonrasında mavi süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Geri kalan katı kısım için 5 mL metanol ile iki kez ekstraksiyon tekrar edildi ve elde edilen tüm ekstraktlar birleştirildi. Bu işlemden sonra evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılan metanol ekstraktı ultra saf su ile çözüldü. Sulu faz üzerine 5'er mL olmak üzere ikişer kez sırasıyla hekzan, dietil eter, etilasetat ve n-bütanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Farklı balonlara alınan her bir ekstraktın çözücüsü evaporatörde uçuruldu. Kuru ekstraktlar 1 mL metanolde çözüldü ve suyla uygun oranlarda seyreltilerek 0,2 µm boyutunda HPLC filtrelerinden geçirilip HPLC-DAD analizleri gerçekleştirildi.



**Şekil 15.** *P. americana* metanol ekstraktının eter, etilasetat, bütanol, sulu ve asidikhidroliz organik ekstraktları

### **2.3. *Phytolacca americana* L. Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri**

#### **2.3.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller**

Tüm analitik seviyedeki fenolik standartlar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilirken vanilik asit Fuluka marka kullanıldı. HPLC grade asetonitril, metanol, etanol, etil asetat, asetik asit ve eter ise Merck (Darmstad, Almanya) firmasından alındı.

Bu çalışmada, kimyasal madde ve bitki örneklerini tartmak için Precisa analitik terazi, ekstraksiyonu gerçekleştirmek için Heidolph ısıtıcı çalkalayıcı, numunelerin çözünmesine yardımcı olmak için Bandelin Sonorex su banyosu, çöktürme işlemi için Hettich santrifüj, kurutma işlemleri için Oven etüv, çözeltileri karıştırmak için Velp Scientifica vorteks, ultra saf su temini için Human Corporation su destile sistemi kullanıldı. Ekstraksiyon sonrası çözücüyü uzaklaştırmak amacıyla Heidolph evaporatör kullanıldı. Toplam fenolik içerik, belirlemede absorbans ölçmek için Thermo Scientific Multiskan Go spektrofotometre kullanıldı.

### 2.3.2. HPLC-DAD Analiz Koşulları

HPLC analizleri bir DAD dedektör ile donanımlı Thermo Dionex Ultimate 3000 seri analitik HPLC sistemde yapıldı. Sistem Chromeleon program ile kontrol edildi. Tüm analizler için Agilent PLRP-S C18 (150 mm × 4,6 mm i.d., 100 Å pd) kolonu kullanıldı. Ayrıca ön kolon olarak kolonla uyumlu iç çapı 3 mm Macherey Nagel marka kolon kullanıldı. Hareketli faz (A) % 2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) % 70 asetonitril-su çözeltileri kullanıldı. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı. Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-3 dk % 5,5 B; 3-10 dk % 5,5-23 B; 10-20 dk % 23-31B; 20-30 dk % 31-56B; 30-40 dk % 56-85 B; 40-45 dk % 85-5,5 B; 45-60. dakikalar arasında başlangıç koşullarına dönüldü. Akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL idi. Kolon sıcaklığı 30°C ve örnek saklama sıcaklığı 18°C idi. Dedektör 254, 280, 315 ve 370 nm'dekromatogram almak üzere 200-400 nm aralığında çalıştırıldı.

Yöntemin kantitatif performansı ve doğrusallığı, her bir standart fenolik bileşiğin % 56 metanol içerisinde hazırlanan 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 ve 0.25 mg/L derişim düzeylerinde kalibrasyon eğrileri kullanılarak izlendi.

### 2.3.3. Bitki Ekstraktlarında DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

Çalışmada DPPH•radikalinin metanol ile 100 µM'lık çözeltisi hazırlandı. Metanol ile çözülerek farklı derişimlerde hazırlanan ekstraktlar ve fraksiyonlar eşit hacimde DPPH• çözeltisiyle karıştırılıp oda sıcaklığında ve karanlıkta 50 dakika bekletildi. 517 nm dalga boyunda derişimlere karşı bulunan absorbanlar grafiğe geçirilerek SC<sub>50</sub> değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı. Kör olarak DPPH• çözeltisinin ve ekstraktların çözüldüğü çözücü olan metanol kullanıldı. Çalışmada gallik asit, kuersetin, kamferol ve izoramnetin standart olarak kullanıldı. Pipetleme işlemleri Tablo 1' de verildi.



**Tablo 1.** DPPH radikal temizleme aktivitesi yöntemi için deney şartları

	<b>Kör</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Ekstrakt</b>
Ekstrakt	150 µL	-	150 µL
Metanol	150µL	150 µL	-
DPPH• (100 µM)	-	150 µL	150 µL
50 akika bekletildi ve 517 nm'deabsorbanslar okundu			

### 2.3.4. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Çalışmada Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik madde tayini, gallik asit ve kuersetin standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiklerine göre değerlendirildi (Singleton vd., 1999). Metoda göre 20 µL 6 farklı derişimde (0,600; 0,300; 0,150; 0,075; 0,0375 ve 0,01875 mg/mL) gallik asit, kuersetin veya kör deneme için metanol, 400 µL 0,2 N Folin-Ciocalteu reaktifi ve 680 µL destile su karıştırılarak vortekslendi ve 3 dakika bekletildi. Karışıma 400 µL %10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek vortekslenip 2 saat oda koşullarında bekletildi. Bekletmenin ardından 760 nm' de absorbansları ölçüldü ve standartlara ait kalibrasyon grafikleri çizildi. Bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri (GAE) ve kuersetin eşdeğeri (KE) cinsinden mg gallik asit eşdeğeri/g ekstrakt ve mg kuersetin eşdeğeri/g ekstrakt şeklinde hesaplandı. Tablo 2'de uygulama süreçleri ayrıntılı olarak verildi.

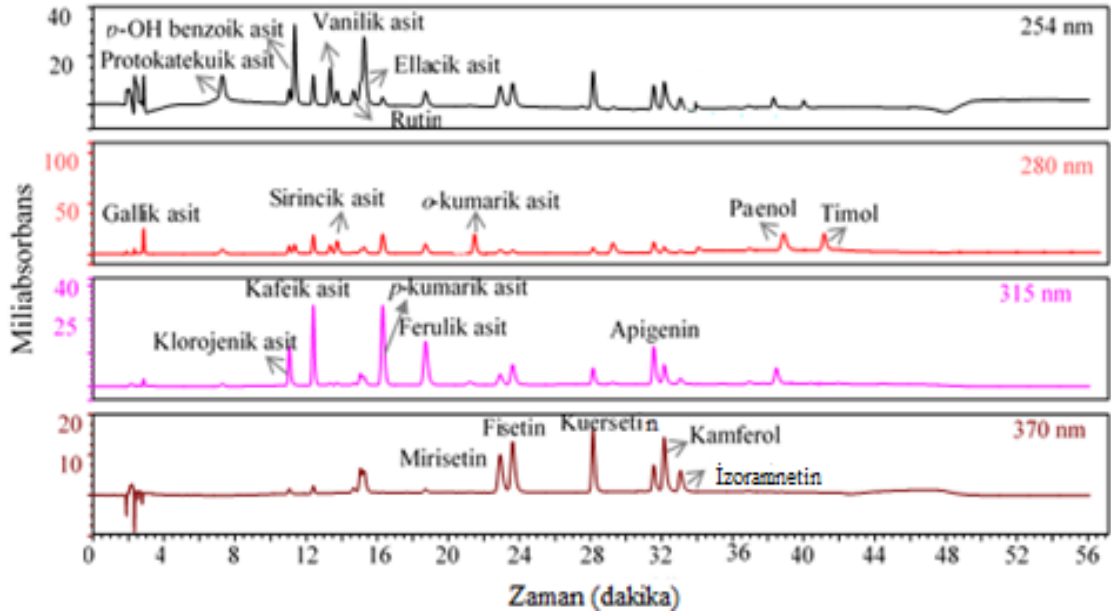
**Tablo 2.** Toplam fenolik madde tayininin uygulama aşamaları

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Ekstrakt</b>
Metanol	20 µL	-	-
Standart	-	20 µL	-
Ekstrakt	-	-	20 µL
Saf su	680 µL	680 µL	680 µL
0,2 N Folin reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vorteks ile karıştırıldı, 3 dakika sonra			
% 2 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	400 µL	400 µL	400 µL
2 saat oda koşullarında bekletildi ve 760 nm'deabsorbans ölçüldü			

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Metot Optimizasyonu

Optimize edilen kromatografik şartlar yirmi standart fenolik bileşiğin ayrımı için yeterliydi (Şekil 16). Yöntemin seçiciliği 20 fenolik standart karışımın iyi bir şekilde ayrılması için en uygun kolon kullanılarak, kararlı kolon sıcaklığında ve ayırım için uygun çözücüler ve gradiyent elüsyonla birlikte uygun dedeksiyon aralığı kullanılarak belirlendi. Standart derişimine karşı elde edilen absorbands değerlerinin doğrusallığı korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) hesaplanarak belirlendi ve Tablo 4' te verildi. Çalışılan derişim aralığında 1'e yakın korelasyon katsayıları ile ( $R^2 \geq 0,999$ ) yüksek doğrusallık elde edildi. 0,5 mg/L derişimindeki standart karışımının optimize edilen HPLC-DAD koşullarında 7 kez analizi değerlendirilerek düşük varyasyon katsayıları ( $CV < 5$ ) ile alıkonma zamanı ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği kabul edilebilir seviyede bulundu. Analitin mevcut olup olmadığını belirlemek için gerekli olan en küçük miktar LOD ve güvenilir kantitatif analiz yapabilmek için gerekli en küçük miktar LOQ değerleri mg/L cinsinden Tablo 3' te verildi.



Şekil 16. Optimize edilen HPLC-DAD metodu kullanılarak 5 mg/L derişimde 20 standart fenolik bileşiğin 254, 280, 315 ve 370 nm'deki kromatogramları

**Tablo 3.** Geliştirilen HPLC-DAD metodunun validasyon parametreleri

No	Standardın Adı	RT <sub>ort</sub> <sup>a</sup>	<sup>b</sup> CV (RT)	<sup>b</sup> CV(Alan)	<sup>c</sup> LOD	<sup>c</sup> LOQ
1	Gallik asit	2,98	0,581	0,184	0,002	0,006
2	Protokatekuik asit	7,19	0,660	0,892	0,013	0,040
3	Klorojenik asit	11,02	0,136	0,095	0,001	0,004
4	<i>p</i> -OH Benzoik asit	11,31	0,182	0,807	0,011	0,030
5	Kafeik asit	12,37	0,165	0,186	0,003	0,008
6	Vanilik asit	13,32	0,088	0,304	0,004	0,013
7	Şirincik asit	13,70	0,059	0,213	0,003	0,009
8	Rutin	15,05	0,022	0,235	0,003	0,010
9	Ellacik asit	15,21	0,047	0,244	0,003	0,009
10	<i>p</i> -Kumarik asit	16,27	0,083	0,349	0,005	0,015
11	Ferulik asit	18,67	0,058	0,802	0,012	0,035
12	<i>o</i> -Kumarik asit	20,55	0,166	0,840	0,011	0,033
13	Mirisetin	22,86	0,015	0,254	0,001	0,001
14	Fisetin	23,57	0,012	0,110	0,001	0,003
15	Kuersetin	28,12	0,005	0,043	0,001	0,001
16	Apigenin	31,55	0,013	0,690	0,010	0,029
17	Kamferol	32,14	0,014	0,036	0,001	0,001
18	İzoramnetin	33,05	0,020	0,525	0,006	0,018
19	Paenol	38,80	0,012	0,032	0,001	0,001
20	Timol	40,68	0,010	0,680	0,009	0,028

<sup>a</sup>: Zaman birimi dakika cinsindedir; <sup>b</sup>: CV: Varyasyon katsayısı; <sup>c</sup>: Değerler mg/L cinsinden verildi.

### 3.2. Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri

Ekstraktlarda tanımlanan ve kantitatif olarak analiz edilen *p*-OH benzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, şirincik asit, rutin, ferulik asit, kuersetin ile birlikte kateşin, vanilik asit, apigenin, luteolin, şirincik asit ve rutin bileşiklerinin türevleri DAD detektörü sayesinde mevcut olan UV spektrumları ile karakterize edildi. Kullanılan HPLC-DAD yöntemi ile kalibrasyon değerlerine sahip olan fenolik bileşiklerin haricinde aydınlatılan ya da karakterize edilen bileşikler için spektroskopik olarak en yakın benzerliğe sahip olan standardın kalibrasyon verileri kullanılarak miktar tayin

edildi. Böylece karakterize edilen *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, şirincik asit, apigenin ve rutin türevleri ilgili standardın eş değeri olarak hesaplandı. Öte yandan kullanılan HPLC-DAD yönteminde standardına ait kalibrasyon değeri olmayan kateşin ve luteolin türevleri için aynı kolon ve HPLC-DAD sistemi ile optimize edilen başka bir yöntemin verileri kullanıldı. Böylece kateşin ve luteolin türevleri ilgili standartlara ait regresyon eşitlikleri kullanılarak sırasıyla kateşin ve luteolin eş değeri olarak değerlendirildi. Kullanılan HPLC-DAD yöntemindeki standartlara ek olarak kateşin ve luteolinin regresyon denklemleri Tablo 4' te verildi.

**Tablo 4.** Geliştirilen HPLC-DAD metodunun kalibrasyon parametreleri

No	Standardın Adı	R <sup>2</sup>	UV-Maksimum (nm)	Regresyon denklemi
1	Gallik asit	0,999	280	y=0,482x-0,060
2	Protokatekuik asit	0,999	254	y=0,253x-0,001
3	Kateşin	1,000	280	y=0,211x+0,009
4	Klorojenik asit	0,999	315	y=0,473x-0,005
5	<i>p</i> -OH Benzoik asit	1,000	254	y=1,081x+0,020
6	Kafeik asit	0,999	315	y=0,895x+0,030
7	Vanilik asit	0,999	254	y=0,524x+0,010
8	Şirincik asit	0,999	280	y=0,520x-0,091
9	Rutin	0,999	254	y=0,226x-0,020
10	Ellacik asit	0,999	254	y=1,295x-0,142
11	<i>p</i> -Kumarik asit	1,000	315	y=1,274x-0,020
12	Ferulik asit	0,999	315	y=0,881x+0,060
13	<i>o</i> -Kumarik asit	0,999	315	y=1,021x+0,961
14	Mirisetin	0,999	370	y=0,589x-0,130
15	Fisetin	0,999	370	y=0,760x-0,112
16	Luteolin	0,997	254	y=1,072x+0,246
17	Kuersetin	1,000	370	y=0,661x-0,050
18	Apigenin	1,000	315	y=0,288x-0,010
19	Kamferol	0,999	370	y=0,646x-0,051
20	İzoramnetin	0,999	370	y=0,268x+0,030
21	Paenol	0,999	280	y=0,765x-0,242
22	Timol	0,999	280	y=1,219x-0,161

*P. americana* meyvesinin metanol ekstraktı ve ondan üretilen altı ekstrakt olarak toplam yedi ekstraktı optimize edilen HPLC-DAD yöntemi ile analiz edildi. Ekstraktların birbirleriyle karşılaştırmasının kolay olması açısından HPLC-DAD ile analiz edilen konsantrasyonlarının aynı olması sağlandı. Sadece kuru etil asetat ekstraktı 50 mg/mL olacak şekilde metanol ile çözüldü ve diğer 6 ekstraktın metanol ile çözülerek hazırlanan çözeltileri 100 mg/mL idi. Kromatografik ayırımdan önce metanolde hazırlanan tüm ekstraktlar suyla %44 oranında seyreltildi ve filtreden geçirildi. Kromatografik verilerin analizlerinde seyreltmeler dikkate alınarak uygun katsayı ile çarpıldı.



**Tablo 5.** HPLC-DAD ile ekstraktlarda belirlenen fenolik madde miktarı ( $\mu\text{g/g}$  ekstrakt)

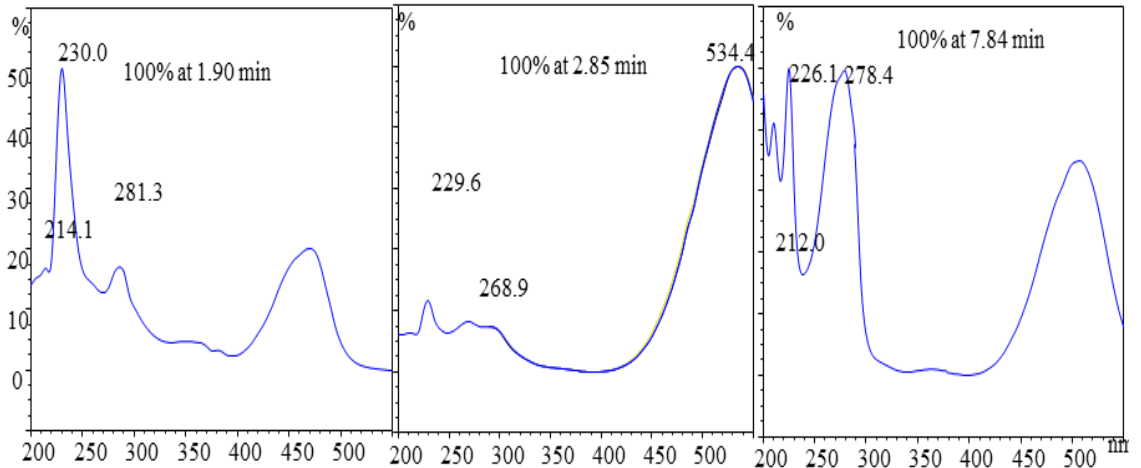
No	RTort	Bileşik	Metanol	Eter	Etil asetat	Bütanol	Su	H. Org
1	8.32	Şirincik asit türevi-1	G	G	G	G	G	853.8
2	9.423	<i>p</i> -OH benzoik asit türevi-1	G	G	G	G	G	287.6
3	9.95	<i>p</i> -Kumarik asit türevi	G	G	G	62.4	G	G
4	11.41	<i>p</i> -OH benzoik asit	G	3.6	G	G	G	242.6
5	12.50	Kafeik asit	G	6.8	G	G	G	G
6	12.93	Rutin türevi-1	G	G	634.8	G	G	G
7	13.44	Vanilik asit	G	5.2	39.1	G	G	529.4
8	14.12	Şirincik asit	G	G	926.1	G	G	3239.8
9	14.63	Rutin türevi-2	G	G	G	477.8	G	G
10	14.76	Rutin türevi-3	28.0	G	G	831.0	G	G
11	15.21	Rutin	60.6	G	G	832.6	122.2	G
12	16.01	Apigenin türevi-1	G	G	G	552.4	G	G
13	16.31	Rutin türevi-4	288.6	G	G	G	G	G
14	16.33	Luteolin türevi-1	G	G	G	189.7	G	G
15	16.57	Rutin türevi-5	318.1	G	2305.2	5541.0	G	G
16	17.03	Luteolin türevi-2	216.3	G	G	212.0	12.7	G
17	17.05	Apigenin türevi-2	G	G	333.5	G	G	G
18	17.17	Kuersetin türevi-1	G	G	G	G	G	226.0
19	17.97	Kuersetin türevi-2	G	G	G	G	G	44.8
20	18.03	Kateşin türevi	77.2	275.7	9437.7	G	G	G
21	18.92	Luteolin türevi-3	45.4	G	G	1050.4	G	G
22	18.94	Apigenin türevi-3	G	G	2121.7	G	G	G
23	18.93	Ferulik asit	G	41.5	G	G	G	144.3
24	21.70	Vanilik asit türevi-1	G	28.8	850.9	G	G	G
25	22.23	Vanilik asit türevi-2	44.1	386.6	8233.0	G	G	G
26	23.53	Vanilik asit türevi-3	16.8	162.7	3099.4	G	G	G
27	27.72	Apigenin türevi-4	G	251.7	1628.1	G	G	G
28	28.10	Apigenin türevi-5	G	166.7	1005.6	G	G	G
29	28.28	Kuersetin	G	G	G	74.2	G	G
30	28.84	Vanilik asit türevi-4	G	27.1	G	G	G	G
31	29.43	Vanilik asit türevi-5	G	39.7	G	G	G	G
32	31.6	Luteolin türevi-4	G	G	G	G	G	136.9
33	32.07	Apigenin türevi-6	G	76.8	250.4	G	G	G
34	32.33	Apigenin türevi-7	G	G	190.8	G	G	G
35	32.58	Apigenin türevi-8	G	104.7	261.5	G	G	G
36	32.82	Şirincik asit türevi-2	G	G	380.1	256.3	G	G
37	37.06	<i>p</i> -OH Benzoik asit türevi-2	G	G	G	G	G	1738.6
		Toplam	1095	1577	31698	10080	135	7444

G: Gözlenmedi; H. Org: Hidrolizli organik ekstrakt

*P. americana* meyvesinin toplam yedi ekstraktı optimize edilen HPLC-DAD yöntemi ile analizleri incelendiğinde etil asetat ekstraktının en zengin fenolik içeriğine sahip olduğu görülmektedir (Tablo 5). Etil asetat ekstraktına fenolik madde miktarları açısından en yakın olan bütanol ekstraktının HPLC-DAD ile belirlenen içeriği bu ekstraktan 3 kat daha düşük bulundu. Ekstraktlarda kromatografik yöntemde kullanılan standartlar ile örtüşen başlıca bileşenler, *p*-OH benzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, şirincik asit, rutin, ferulik asit ve kuersetindir.

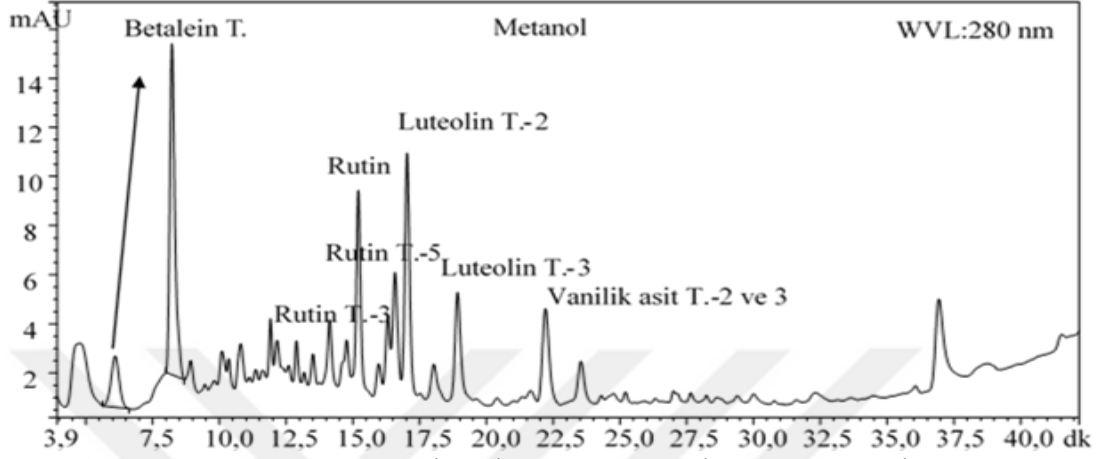
Ekstraktlara polariteleri açısından bakıldığında polaritesi yüksek metanol, bütanol ve sulu ekstraktların kromatogramlarında ilk 22 dakikada pik yoğunluklarının fazla olduğu, eter ve etil asetat ekstraktlarının kromatogramlarında piklerin kromatogramın başından sonuna kadar aynı yoğunlukta olduğu gözlemlendi.

Metanol, bütanol ve sulu ekstraktlarda ayrıca ilk dakikalarda çözücü piki ile birlikte elue edilen renkli piklere rastlandı. Uzun dalga boyunda absorbanza sahip olan bu piklere 13. dakikalara kadar rastlandı. Spektrumlarında turuncudan mora yakın (430-550 nm) dalga boyunda maksimum dalga boyuna sahip piklerin *P. americana* bitkisinin içeriğindeki renkli bileşikler olan betalainlere ait olduğu literatüre de dayandırılarak belirlendi (Şekil 17) (Willibald vd., 1996).



Şekil 17. Betalain olarak karakterize edilen piklere ait UV spektrumları

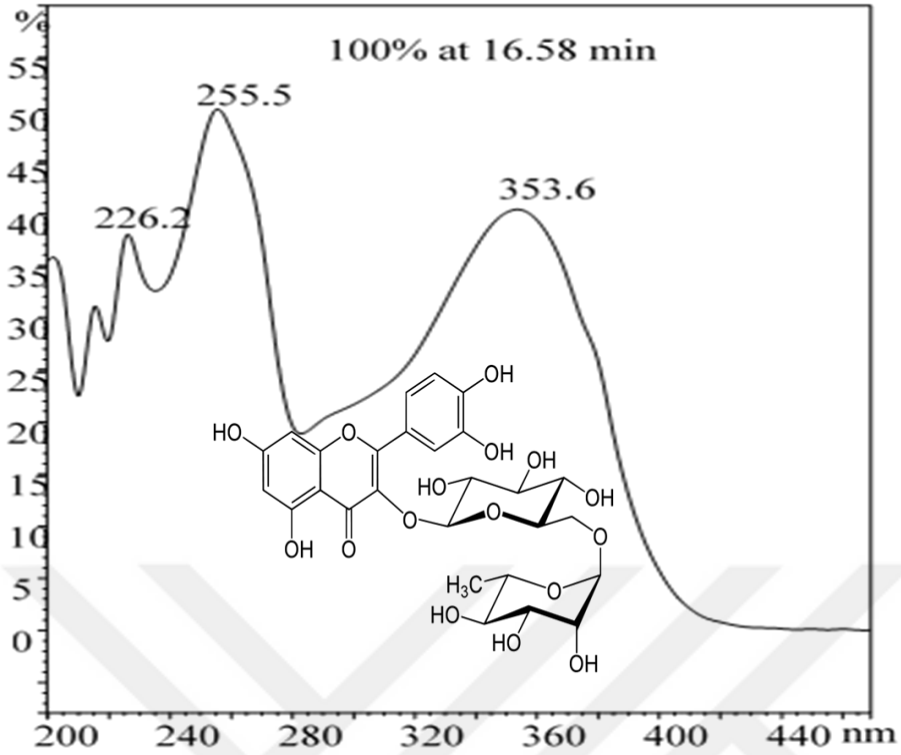
Metanol ekstraktının içeriğinde rutin türevleri, luteolin türevleri, kateşin türevi, rutin ve vanilik asit türevleri bulunmaktadır. Bu ekstraktın 280 nm'deki kromatogramı Şekil 18' de gösterildi.



Şekil 18. *P. americana* metanol ekstraktının 280 nm' de HPLC-DAD kromatogramı

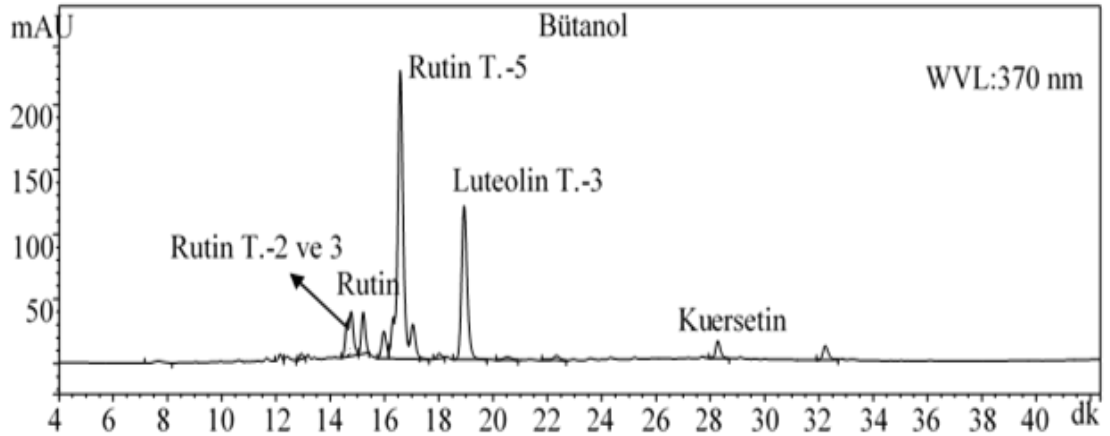
Rutin en yüksek bütanol fraksiyonunda gözlenirken, metanol ekstraktı ve sulu fraksiyonda da gözlemlendi (Tablo 5). İçeriğindeki rutinozit şekeri sayesinde polaritesi artan bu flavonol tipi bileşiğin belirlenen 5 tane türevinden ilk ve son elue edilenler etil asetat fraksiyonunda da tespit edilirken bütanol fraksiyonu rutin türevleri açısından en zengin ekstrakt idi. Rutin türevlerinin seçilen temsili UV spektrumu molekül yapısı ile birlikte da Şekil 19'da verildi.





Şekil 19. Rutin türevlerinin UV spektrumu

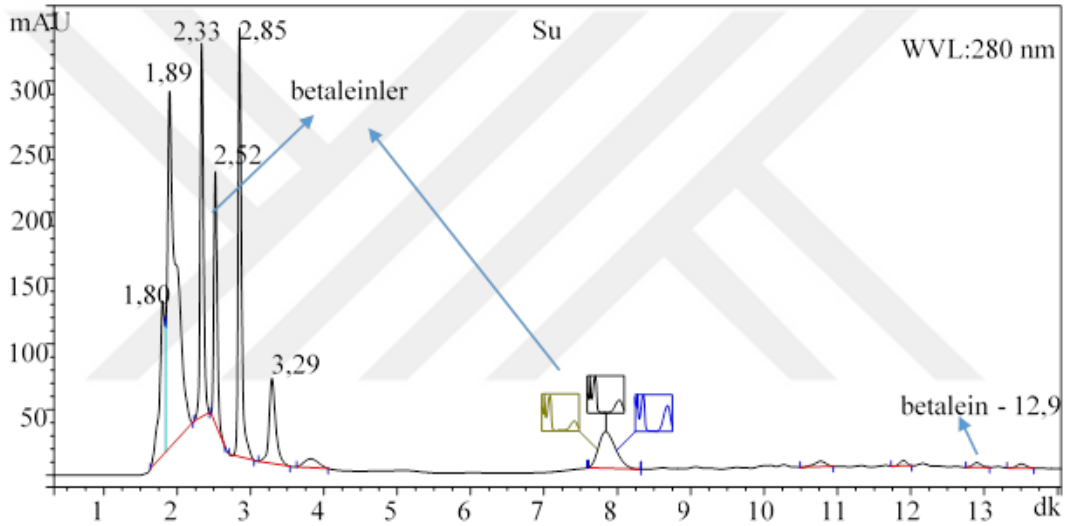
Bütanol ekstraktının içeriğinderutin türevleri, luteolin türevleri, rutin, apigenin türevi, şirincik asit türevi, kuersetinin yanı sıra, *p*-kumarik asit türevi tespit edildi. Bu ekstraktın 370 nm'deki kromatogramı Şekil 20' de gösterildi.



Şekil 20. *P. americana* bütanol ekstraktının 370 nm'de HPLC-DAD kromatogramı

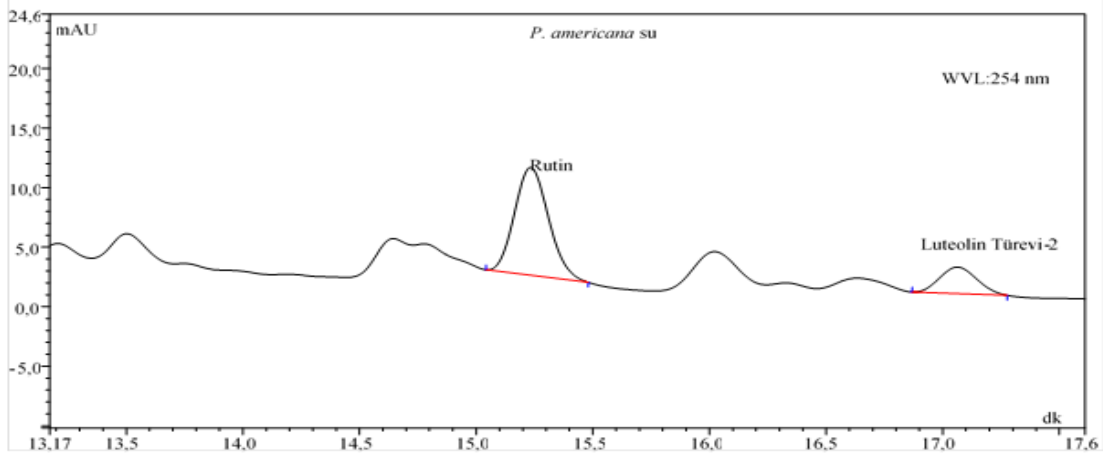
Bütanol ekstraktında sulu ekstrakt gibi çözücü pikinin gözleendiği ilk dakikalarda renkli bölgede maksimum absorban veren oldukça yüksek pikler bulunmaktadır. Bu ekstraktın Şekil 15’ te görüldüğü gibi turuncu renginin betalainlerden kaynaklanması muhtemeldir.

Su ekstraktının kromatogramında, 5 tanesi ilk 4 dakikada, ikisi 7,8 ve 12,9. dakikada gelen pikler UV spektrumlarında 465, 500 ve 535 nm’de maksimum dalga boyuna sahiptir (Şekil 21). Bunların literatürde de bu bitkide olduğu rapor edilen betalainler olması muhtemeldir.



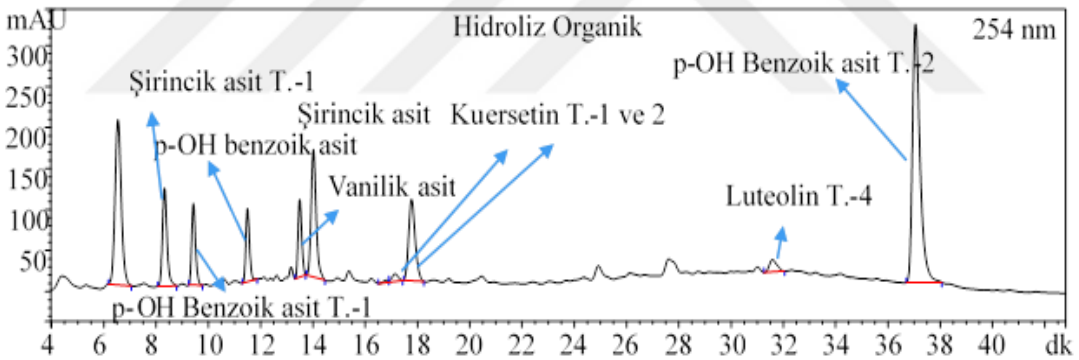
Şekil 21. *P. americana* su ekstraktının 280 nm’de HPLC-DAD kromatogramı

Su ekstraktının 254 nm’deki kromatogramı 13,17-17,61 dakikalar arasında odaklanmış olarak Şekil 22’de gösterildi. Su ekstraktında rutin ve luteolinin bir türeviden belirlendi. Rutinin yine şeker grubu içeren bir bileşik olması ve polaritesinin yüksek olması dolayısıyla sulu ekstraktta bulunması beklenen bir sonuçtur. Luteolin türeviden olan bileşiğin de yine aynı sebeplerden dolayı şeker grubu içermesi beklenir.



Şekil 22. *P.americana* su ekstraktının 254 nm’de HPLC-DAD kromatogramı

Hidroliz organik ekstraktının içeriğinde şirincik asit, *p*-OH benzoik asit türevleri, şirincik asit türevi, vanilik asit, *p*-OH benzoik asit, kuersetin türevi, ferulik asit, luteolin türevi, kuersetin türevi gözlemlendi. Hidroliz organik ekstraktının 254 nm’deki kromatogramı Şekil 23’ te verildi.

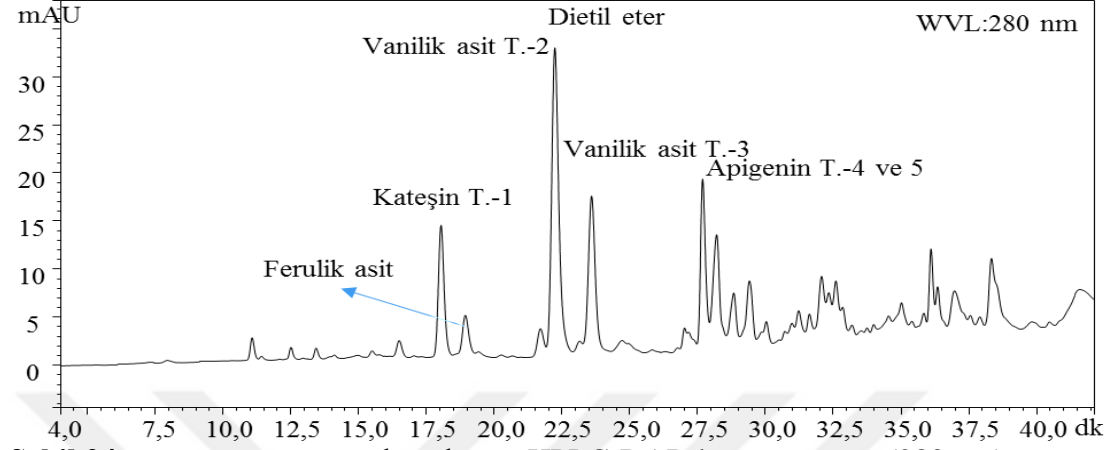


Şekil 23. *P. americana* hidroliz organik ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı

Hidroliz su ekstraktının içeriğinde kullanılan HPLC-DAD yöntemi ile belirgin herhangi bir bileşiğe rastlanmadı. Bu sonuç hidrolizden sonra eter ve etil asetat ile uygulanan sıvı-sıvı ekstraksiyonunun bu bitkinin meyve ekstraktı için yeterli olduğunu ve sulu kısımdan fenolik bileşikler etkili bir şekilde ekstrakte ettiklerini gösterdi.

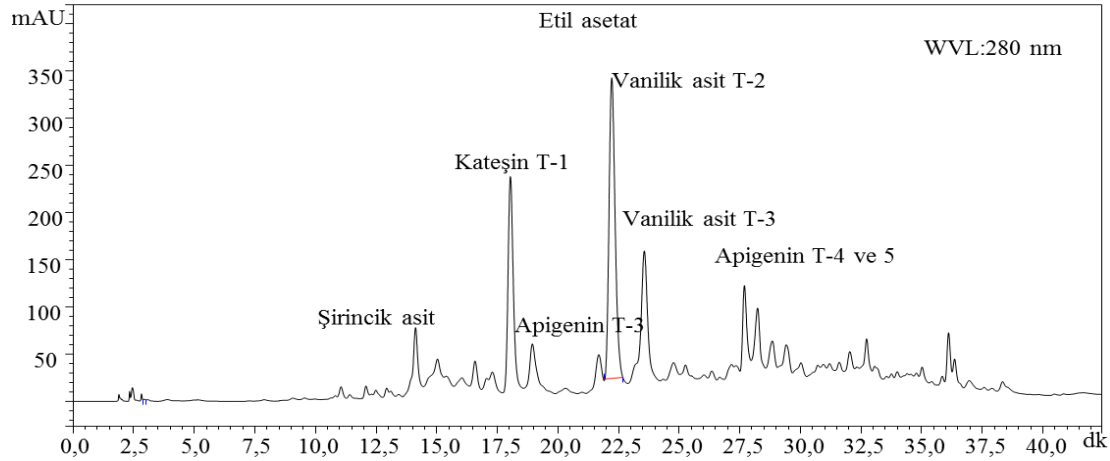
HPLC-DAD sisteminde yürütülen dietil eter ekstraktının içeriğinin standart karışım ile karşılaştırıldığında vanilik asit türevleri, kateşin türevi, apigenin türevleri, ferulik asit, kafeik asit, vanilik asit, *p*-OH benzoik asit bakımından zengin olduğu

görülmektedir. Eter ekstraktının içinde miktar olarak en yüksek vanilik asit türevleri, ardından apigenin türevleri ve kateşin türevi gözlemlendi (Şekil 24).



Şekil 24. *P. americana* eter ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (280 nm)

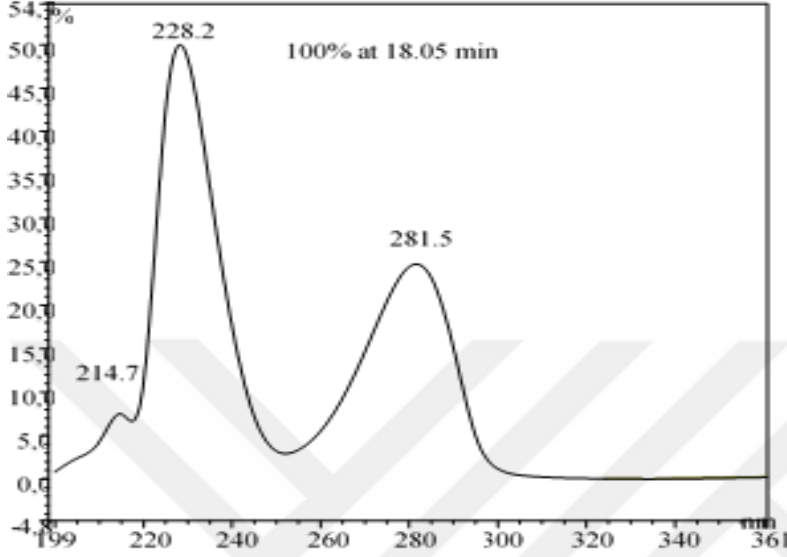
Etilasetat fraksiyonunun kateşin türevi, vanilik asit türevleri, rutin türevleri, apigenin türevleri, şirincik asit, şirincik asit türevi ile birlikte vanilik asit içerdiği belirlendi. Etilasetat fraksiyonunun 280 nm'deki kromatogramı Şekil 25'te verildi.



Şekil 25. *P. americana* etilasetat ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (280 nm)

Etil asetat fraksiyonunun kromatogramında 10. dakikadan 37. dakikaya kadar geniş aralıkta pik yoğunluğu gözlemlendi (Şekil 25). Kantitatif içerik olarak etil asetat fraksiyonu eter fraksiyonundan zengindir. Öte yandan bu iki fraksiyonun kromatogramlarındaki pik profilleri oldukça benzerlik göstermektedir.

Flavan-3-ol sınıfından bir flavonoid olan kateşinin bir türevi, metanol ekstraktı, eter ve etilasetat fraksiyonlarında ortak olarak gözlemlendi ve UV spektrumu Şekil 26' daki gibidir.



Şekil 26. Kateşin türevinin UV spektrumu

### 3.3. *P. americana* L. Bitkisinin Antioksidan Kapasitesi

*P. americana* bitkisinin ekstraktları, toplam fenolik içerik ve DPPH radikal temizleme aktivitesi açısından spektrofotometrik olarak incelendi. Ekstraktların toplam fenolik içerikleri gallik asit eşdeğeri cinsinden (GAE) ve kuersetin eşdeğeri cinsinden (KE) hesaplandı. En yüksek toplam fenolik içerik hem gallik asit hem de kuersetin eşdeğeri cinsinden etilasetat ekstraktında (83,604 mg GAE/g, 44,488 mg KE/g) gözlemlenirken, en düşük toplam fenolik içerik 3,604 mg GAE/g, 1,956 mg KE/g değerleriyle eter ekstraktında elde edildi. DPPH• radikal temizleme aktivite sonuçlarına bakıldığında ise standart olarak kullanılan gallik asit ve kuersetin standartları içinde kuersetin' in temizleme aktivitesinin daha yüksek olduğu görüldü. DPPH• aktivitesi en yüksek etilasetat fazında gözlemlendi. Toplam fenolik içerik ile DPPH• radikal temizleme aktivitesinin sonuçları Tablo 6'da gösterildi.

**Tablo 6.** *P.americana* L. meyve ekstraktlarının antioksidan kapasitesi

Ekstraktlar	Toplam fenolik madde miktarı		DPPH• Radikal temizleme aktivitesi
	mg GA/g std	mg KE/g std	SC <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )
Metanol	9,077 (±0,821)	3,789(±0,514)	0,910 (±0,196)
Eter	3,604 (±0,096)	1,956(±0,060)	0,829 (±0,033)
Etilasetat	83,604 (±2,860)	44,488 (±2,757)	0,070 (±0,071)
Bütanol	27,117 (±1,333)	15,375 (±0,835)	0,440(±0,033)
Su	22,613 (±1,468)	21,948 (±1,839)	0,218(±0,067)
Hidroliz Organik	34,099 (±1,905)	18,139(±1,193)	0,293(±0,010)
Gallik asit			0,003 (±0,001)
Kuersetin			0,002 (± 0,001)

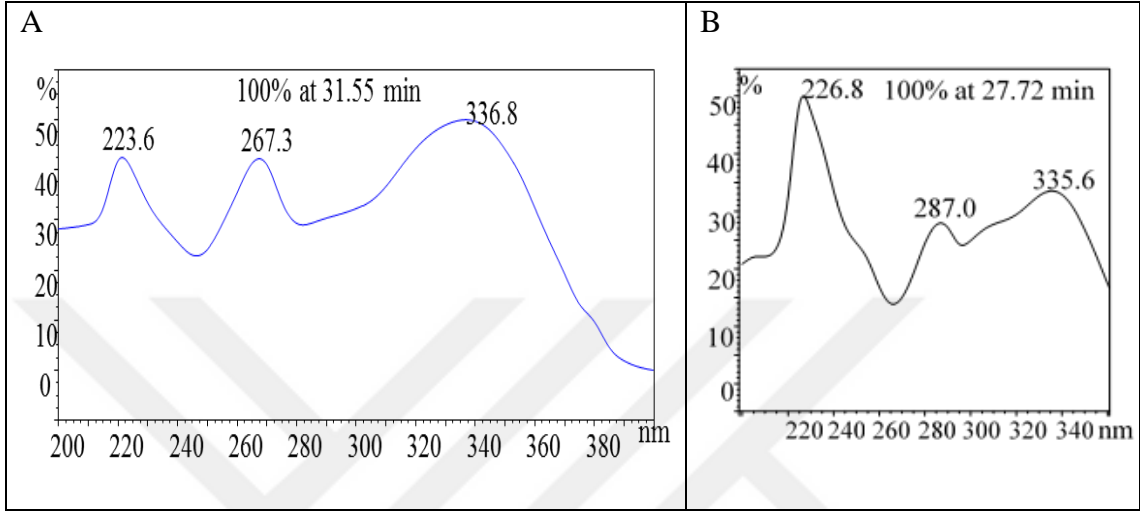
#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

HPLC-DAD analizleriyle kantitatif olarak belirlenen fenolik bileşiklerin miktar olarak ekstraktlarda bulunma sırası etil asetat> bütanol> hidroliz organik (H. Org) >dietyl eter> metanol> su ekstraktı şeklindedir. Ekstraktların içeriklerinde benzer bileşenler olmasına rağmen aynı bileşenlere az rastlanması nedeniyle ekstraktlar arasında farklılıklar gözlenmektedir. Genel olarak hem flavonoid hem de fenolik asit içerikleri zengindir. Ekstraktlarda fenolik asitlerden, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, ferulik asit ve şirincik asit ile birlikte *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, şirincik asit, *p*-kumarik asit, türevlerine rastlandı. Flavonoidlerden ise, rutin ve kuersetinin yanısıra, rutin, kuersetin, apigenin, luteolin ve kateşin türevleri gözlemlendi.

Tüm ekstraktlar metanol ekstraktından oluştuğu için bu ekstraktın en yüksek içeriğe sahip olması beklenirdi. Ancak diğer çözücüler ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu sayesinde aslında gözlenme sınırının altında kalan bileşiklerin zenginleştirilerek alındığı görüldü. Fenolik bileşikler etil asetat tarafından daha yüksek oranda ekstrakte edildi ve bu da polaritelerin etil asetata en yakın olduğunu gösterdi. Bu ekstrakt hem fenolik asitler hem de flavonoidler açısından oldukça zengindir. Bütanol ekstraktının ise flavonoidlerce daha zengin olduğu Tablo 3'te görülmektedir.

Metanol ekstraktının eter, etil asetat ve bütanol fraksiyonlarının kromatogramlarında UV spektrumları apigenin ile aynı olan pikler gözlemlendi. Bu pikler apigenin türevi olarak adlandırıldı ve miktarları apigeninin kalibrasyon denklemi kullanılarak apigenin eşdeğeri olarak hesaplandı. Standart apigenin için optimize edilen HPLC-DAD yöntemi ile elde edilen alıkonma zamanı 31,55 dakikadır. Toplamda gözlenen 8 apigenin türevinden yalnızca 3 tanesi standart apigenin pikinden sonra elue edildi. Bundan dolayı erken elue edilen 5 apigenin türevinin polariteleri apigeninden daha yüksek, son 3 apigenin türevinin ise polaritelerinin daha düşük olduğu sonucuna varıldı. Apigenin ya da 4',5,7-trihidroksiflavon, A halkasında 2 ve B halkasında 1 tane olmak üzere 3 tane -OH grubu içeren bir flavondur (Şekil 26). Flavonoidler genel olarak -OH grupları ile glikozit, asetil, *p*-kumaroil, kuinik asit gibi çeşitli gruplara bağlanarak farklılaşırlar. Öte yandan halkadaki karbonlar ile bağlı olan glikozit,

hidroksit ve diğer gruplar sayesinde farklılaşan flavonoid türevlerine de doğal bileşiklerin içeriğinde rastlanmaktadır. Apigenin standardının UV spektrumu ve apigenin türevleri için elde edilen UV spektrumlarından temsili olarak seçilen bir tanesi Şekil 27’ de verildi.



Şekil 27. Apigenin (A) ve apigenin türevlerinin (B) UV spektrumu

Şekil 27-B’ deki temsili spektrumda flavon yapısının UV bandına karşılık gelen 287 nm, apigeninin UV bandı olan 265 nm’ den daha görünür bölgeye doğru yani kırmızıya kaydığı gözlemlendi. Kırmızıya kayma genellikle halkaya katılan elektron çekici örneğin –OH gibi grupların varlığında gözlenmektedir. Bu temel enstrümantal bilgileri ve literatürdeki flavon tipi bileşiklerin UV spektrum verileri incelendiğinde bu yapının apigenin yapısına göre daha fazla hidroksil yada metoksil (-OCH<sub>3</sub>) grubu içeren bir flavon olabileceği düşünüldü (Liu vd., 2009). Alıkonma zamanları açısından bakıldığında standart apigeninden önce elue edilen apigenin türevlerinin polaritelerindeki artış fazladan içerdikleri –OH ve glikozit gruplarından kaynaklanabilir. Örneğin, bir flavon olan scutellarein (5,6,7,4’-tetrahidroksiflavon), apigenine göre A halkasında fazladan bir –OH grubu içerir ve bu nedenle alıkonma zamanı apigeninden daha kısadır (Siraichi vd., 2013). Öte yandan geç elue edilen 3 tane apigenin türevinin ise –OH grupları yerine daha düşük polariteye sahip grupları örneğin, –OCH<sub>3</sub> gruplarını içerdikleri için polaritelerinde düşüş olabilir.

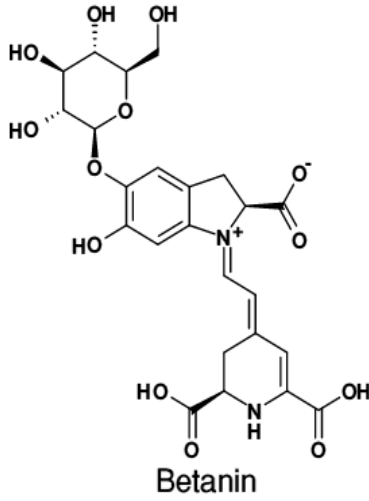


Kafeik asit yalnızca eter ekstraktında bulunurken kuersetin ise yalnızca flavonoidler açısından çok daha zengin içeriğe sahip olan bütanol ekstraktında tespit edildi. Rutin en yüksek bütanol ekstraktında olmak üzere, ardından azalarak su ve metanol ekstraktlarında da tespit edildi. Rutinin, rutin türevlerinin ve hatta diğer flavonoidlerin erken elue edilen türevlerinin hidroliz organik ekstraktında bulunmaması, hidroliz ile başarılı bir şekilde flavonoidlere bağlı şeker guruplarının koparıldığını göstermektedir. Aynı şekilde hidroliz su ekstraktında fenolik bileşiklere rastlanmayışı hatta kullanılan 200-550 nm aralığında pik gözlenmemesi de hidroliz sonucunda uygulanan SIVİ-SIVİ ekstraksiyonunun oldukça yüksek geri kazanıma sahip olduğunu göstermektedir.

HPLC-DAD analizlerine göre hidroliz organik fraksiyonunun toplam fenolik madde miktarı, eter ve etil asetat fraksiyonlarına göre yaklaşık 4,5 kat daha az olduğu gözlemlendi (Tablo 5). Bu durum bazı fenolik bileşiklerin sıcaklık ve pH' ya duyarlı olduğu ve bozunmaya uğradığını gösterdi. Fenolik bileşikler şeker bağlı türevleri halinde daha kararlıdır ancak hidrolizle koparılan bu gruplardan geride kalan yalın hallerinin hidroliz sürecinde bozdukları rapor edilmiştir (Akyüz Turumtay vd., 2014).

Metanol, bütanol ve su ekstraktlarında ilk dakikalarda çözücü piki ile birlikte elue edilen renkli pikler görüldü. Bu piklere ilk 13 dakika içinde rastlandı. Bu piklerin turuncudan mora yakın (430-550 nm) dalga boyunda maksimum dalga boyuna sahip olduğu belirlendi. *P. americana* bitkisinin renkli olmasını sağlayan bileşiklerin betalainler olduğu literatürde belirtilmiştir (Willibald vd., 1996).

Lee ile Kader (2000)' de yaptıkları çalışmada betasiyanidinlerin doğal antioksidan bileşik olduklarını literatürde belirtmişlerdir.



**Şekil 28.** Glikozidik betalain (betanin) yapısı

Betalainler Şekil 28’ de gösterildiği gibi iyonik yapıda olduğu için özellikle daha polar ekstraktlarda ve çözücü piki ile birlikte elue edilmeleri beklenen bir sonuçtur. Bu bileşikler sıcaklık ve pH ya karşı hassasiyetlerinden dolayı hidroliz edilen ekstraktlarda gözlenmedi. Su ekstraktı fenolik bileşiklerden yalnızca rutin ve luteolin türevi-2 olarak karakterize edilen bileşikleri içermektedir ki bu da dietil eter, etil asetat ve bütanolün metanol ekstraktında var olan fenolik bileşikleri oldukça iyi ekstrakte ettiklerini gösterdi. Öte yandan su ekstraktının renginin Şekil 15’ te verildiği gibi koyu mor renkli olması ve betalainler olarak karakterize edilen bileşiklerce zengin olması bu bileşiklerin iyonik yapılarından dolayı organik çözücüler tarafından düşük oranda ekstrakte edildiklerini ortaya koydu. Betalainler gıda maddelerinde sentetik organik boyar maddelerinin yerini tutabilecek potansiyele sahip önemli pigmentlerdir. Willibald vd. (1996)’ da yaptıkları çalışmada *P. americana*’nın hücre kültürlerinden elde edilen beta-siyaninler, bitkinin kökleri ve olgunlaşmış meyveleri ile karşılaştırıldı ve sonuç olarak meyve kısmında prebetanin (betanin 6’-O-sülfat) ve izoformlarına baskın şekilde rastlanıldı.

*P. americana*’nın meyve ekstraktlarının toplam fenolik içerik ve DPPH radikal temizleme aktiviteleri de spektrofotometrik yöntemler kullanılarak incelendi. En yüksek toplam fenolik içerik ve DDPH radikal temizleme aktivitesi etil asetat fraksiyonunda gözlemlendi. Toplam fenolik bileşik miktarı gallik asit cinsinden ekstraktlarda sırasıyla etil

asetat> hidroliz organik> bütanol> su> metanol ve dietil eter şeklindeydi. Kuersetin eşdeğeri cinsinden bakıldığında sıralamada sulu fraksiyonun toplam fenolik içeriği bütanol ve hidroliz organik fraksiyonundan daha yüksek bulundu. Sulu fraksiyonun radikal temizleme aktivitesi de bütanol ekstraktından yüksek bulundu. HPLC-DAD sonuçlarına göre sulu fraksiyon en az fenolik bileşiğe sahip iken, spektrofotometrik yöntemler ile yüksek fenolik içerik ve güçlü antioksidan özellik sergilemesi içeriğinde başka biyoaktif ve fenolik grup içeren bileşenlerinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Bu biyoaktif bileşenlerin sulu fraksiyona yoğun renklilik veren betalainler olması muhtemeldir ki, HPLC-DAD kromatogramlarında da bu tür renkli bileşiklere rastlandı (Şekil 15 ve 21).

Literatür çalışmalarına dayanarak genelde renkli bileşiklerin antioksidanca daha zengin yapıda oldukları söylenebilir. Bundan dolayı antioksidan aktivitesinin sulu ve bütanol fraksiyonlarında yüksek olması beklenebilir. Ancak etilasetat fraksiyonunun renginin Şekil 15’ deki sarı olduğu ve en yüksek antioksidan kapasite sergilediği gözlemlendi. Sadece renk şiddetine bakarak ekstraktların antioksidan kapasitelerinin değerlendirilemeyeceği bu şekilde ortaya konuldu. HPLC-DAD analiz sonuçları da en zengin içeriğe sahip olan bu ekstraktın yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu doğrulamaktadır (Tablo 5).

Sonuç olarak yapılan bu tez çalışmasında *P. americana*'nın meyvelerinin fenolik asitler ve flavonoidlerce oldukça zengin içeriğe sahip oldukları belirlendi. Ayrıca bu meyvelere mor renklerini veren betalain türü bileşiklerin özellikle polar ekstraktlarda yüksek miktarlarda bulunduğu tespit edildi. Bu bitkinin biyoaktif bileşenlerinin zengin olması onu antioksidan, antimikrobiyal, antikanser gibi pek çok özellikler açısından incelenmeye değer kılmaktadır. Bu bitkinin meyvelerinin çeşitli ekstraktlarında biyoaktivite çalışmaları uygulamaya değerdir.

## 5. ÖNERİLER

*P. americana* meyvelerinin fenolik asit içeriği kantitatif olarak HPLC-DAD ile belirlendi. Meyvelerin fenolik asitler ve flavonoidlerce oldukça zengin içeriğe sahip olduğu görüldü.

Bitkinin meyve kısmının fenolik bileşen içeriğinin detaylı incelemesi sonucunda meyvenin tıbbi açıdan değerlendirilmesi gereken değerli kaynak olduğunu söylenebilir. Tez kapsamında kullanılan HPLC-DAD yöntemi ile tüm bileşenlerin tam olarak yapıları ortaya konulamadı. Evrensel bir detektör olan kütle detektörüne (MS) bağlı HPLC sistemi ile bileşenlerin yapı tayinleri ileri bir çalışma olarak yapılabilir. Dahası preparative HPLC yada farklı kromatografik izolasyon yöntemleri kullanılarak meyvelerin ana bileşenleri izole edilebilir. İzole edilen bileşenlerin tek tek biyolojik aktiviteleri araştırılabilir. Bu sayede bitkiden ilaç aktif madde izolasyonu yapılabilir.

## KAYNAKLAR

- Acar, J., 1998.** Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Gıda Kimyası. Editör: İlbilge. Saldamlı, Hacettepe Ün. Basımevi, Ankara Analysis, 41, 1523–1542.
- Akyüz Turumtay, E., Islamoglu, F., Cavus, D., Sahin, H. and Turumtay, H., 2014.** Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). Industrial Crops and Product, 52 (01), 687-694.
- Arimoto-Kobayashi, S., Sugiyama, C., Harada, N., Takeuchi, M., Takemura, M. and Hayatsu, H., 1999.** Inhibitory Effects of Beer and Bloker Alcoholic Beverages on Mutagenesis and Dna. Adduct Formation Onduced by Several Carcinogenesis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 221-230.
- Aron, P.M. and Kennedy, J.A., 2008.** Flavan-3-Ols: Nature, Occurrence and Biological Activity. Mol Nutr Food Res, 52(1):79-104.
- Beckman, C.H., 2000.** Phenolic-Storing Cells: Keys to Programmed Cell Death and Periderm Formation in Wilt Disease Resistance and in General Defence Responses in Plants? Physiological and Molecular Plant Patology. 57: 101-110 belirlenmesi. Gıda, 27(2), 93-98.
- Braun, J. and Tevini, M., 1993.** Regulation of UV Protective Pigment Synthesis in The Epidermal Layer of Rye Seedlings, Photochem, 57:518-523.
- Büyüktuncer, Z. ve Başaran, A., 2005.** Fitoöstrojenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Önemleri. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 25(2), 79-94.
- Cai, Y., Sun, M. and Corke, H., 2003.** Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. J. Agric. Food Chem. 51, 2288–2294.
- Cao, G., Prior, Z. and Revın, L., 1999.** The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, Methods in Enzymology 299, 50-62.
- Cemeroğlu, B., 2004.** Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara, 77-88.
- Daniela, B., Luisa, T., Francesca, T., Di, G., Antonino, B., Mario, A., Anna, M.P., Rohn, K. and Maria, A.L., 2002.** Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin, School of Pharmacy, P.O. Box 12065 50:23, pp 6895–6901

- Erdman, J.W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Hollman, J., Keen, P., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. and Burrowes, J., 2007.** Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, the Journal of Nutrition, 137, 718-737.
- Frank, J., 2004.** Dietary Phenolic Compounds and Vitamin E Bioavailability-Model Studies in Rats and Humans. Doctoral Dissertation ISSN 1401-6249, ISBN 91-576-6453-6.
- Frankel, E.N. and Finley, J.W., 2008.** How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 4901–4908.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A. and Fernandez-Gutierrez, A., 2006.** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41, 1220–1234.
- Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J. and Aruoma, O.I., 1995.** The characterization of antioxidants, Food and Chemical Toxicology, 33, 601-617.
- Harris, D.C., 2007.** Quantitative Chemical Analysis. Freeman and Company, p. 572, 253-255.
- Hasler, C.M., 2002.** Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges – A position Paper From the American Council on Science and Healthy The Journal of Nutrition; 132: 3772- 3781.
- Heim, K.E., Tagliaferro, R. and Bobilya, D.J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, The Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 572-584.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L., 2005.** The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (6), 1841-1856.
- Joy, R.W., Sugiyama, M., Fukuda, H. and Komamine, A., 1995.** Cloning and Characterization of Polyphenol Oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. 1104/pp.107.4.1083
- Kallithraka, S., Garcia-Viguera, C., Bridle, P. and Bakker, J., 1995.** Survey of solvents for the extractions of grape seed phenolics. Phytochem. 6(5), 265-267.
- Kwak, N.S. and Jukes, D.J., 2001.** Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. Food Control; 12: 99-107.

- Liu, G., Ma, J., Chen, Y., Tian, Q., Shen, Y., Wang, X., Chen, B. and Yao, S., 2009.** Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria bacalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4809–4814.
- Maness, L., Goktepe, I., Chen, H., Ahmedna, M. and Sang, S., 2014.** Impact of *Phytolacca Americana* extracts on gene expression of colon cancer cells. *Phytother Res.* 28(2): 219-223.
- Moon, J.K. and Shibamoto, T., 2009.** Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem*, 57, 1655–1666.
- Naczki, M. and Shahidi, F., 2006.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, Extraction and analysis (review). *Journal of Pharmaceutica and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.
- Namiki, M., Yamashita, K., Osawa, T. and Yagi, K., 1993.** Antioxidant and Oxygen Lipid Peroxides and Antioxidants, *Japan Sci. Soc. Pres, Tokyo, Japan*, p.319.
- Niki, E. and Noguchi, N., 2000.** Evaluation of Antioxidant Capacity. What Capacity is being Measured by Which Method? *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50, 323-329.
- Ozcelik, B., Lee, J.H. and Min, D.B., 2003.** Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci*; 68: 487-90
- Perez-Jimenez, J., Arranz, S., Taberner, M., Diaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goni, I. and Saura-Calixto, F., 2008.** Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* 41: 274-85.
- Peterson, J. and Dwyer, J., 1998.** Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18, 1995-2018.
- Poyrazoğlu, E., Velioglu, S. ve Artık, N., 2002.** Bazı Fenolik Asitlerin, antosiyanin property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95, 1, 37–43.
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K., 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem*; 53: 4290-302.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. and Pridham, J.B., 1995.** The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- Ryan, K.J., Ray, C.G., 2004.** *Sherris Medical Microbiology*. Mc Graw Hill, 555–562.
- Siraichi, J.T.G., Felipe, D.F., Brambilla, L.Z.S., Gatto, M.J., Terra, V.A., Cecchini, A.L., Cortez, L.E.R., Rodrigues-Filho, E. and Cortez, D.A.G., 2013.** Antioxidant Capacity of the Leaf Extract Obtained from *Arrabidaea chica* Cultivated in Southern Brazil. *PLoS ONE* 8(8): e72733.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R., 2007.** *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning, 7. Baskı, ISBN: 1305577213, 9781305577213, 992 p., 673-697.
- Su- Youn, P. and Su- Youn, J., 2014.** Technical approaches of a natural dye extracted from *Phytolacca americana* L. berries with chemical mordant. *Technology and Health Care* , 22, 339-343
- Teltow, G., Irvin, J. and Aron, G., 1983.** Inhibition of herpes simplex virus DNA synthesis by pokeweed antiviral protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 23(3): 390–396.
- Termentzi, A., Kefalas, P. and Kokkalou, E., 2006.** Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chemistry*, 98, 599–608.
- URL-1, 2018.** <https://www.researchgate.net/publication/286441036> (07 Nisan 2018).
- URL-2, 2018.** <http://www.pharmacelsus.de/hplc> (23 Ocak 2014).
- URL-3, 2018.** [http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax\\_id=2010](http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=2010) (10 Ocak 2018)
- Wang, L., Bai, L., Nagasawa, T., Hasegawa, T., Yang, X. and Sakai, J., 2008.** Bioactive triterpene saponins from the roots of *Phytolacca Americana*. *J Nat Prod.*, 71(1): 35-40. yapıları ve önemleri *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 5(1), 20-35.
- Willbald, S., Richard, W., Atsushi, K., Manfred, N., Victor, W. and Dieter, S., 1996.** Betacyanins from plants and cell cultures of *Phytolacca americana*, *Phytochemistry*, 1039, 1046.



**Yıldız, H. ve Baysal, T., 2003.** Bitkisel Fenoliklerin Kullanım Olanakları ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Gıda Mühendisliği Dergisi, 29-35.

**Zampini, I.C., Ordoñez, R., Giannini, N.P., Blendinger, P.G. and Isla, M.I., 2011.** Nutraceutical properties and toxicity studies of fruits from four Cactaceae species grown in Argentine Northwestern. Food Research International, 44, 2345–2351.

## ÖZGEÇMİŞ

Ümran KALKAN Malatya'da doğdu. İlköğrenimini ve ortaöğretimini Malatya 23 Nisan İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Liseyi ise Malatya Kubilay Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı ve 2014 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. Lisansüstü eğitimine de 2015 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda başladı ve halen devam etmektedir.

