

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Camellia Sinensis (L.) O. KUNTZE ÇİÇEĞİNİN
EKSTRAKTLARINDAKİ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN HPLC-
DAD İLE AYDINLATILMASI VE BAKTERİYAL DNA-
POLİMERAZ İNHİBİSYONLARI

HAVVA ER

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. EMİNE AKYÜZ TURUMTAY
TEZ JÜRİLERİ
DOÇ. DR. EMRE MENTEŞE
YRD. DOÇ. DR. HALBAY TURUMTAY

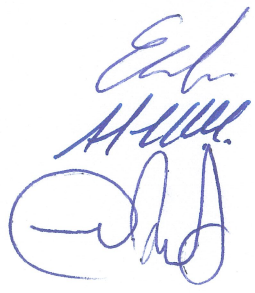
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

RİZE-2017
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Camellia Sinensis (L.) O. KUNTZE ÇİÇEĞİNİN EKSTRAKTLARINDAKİ
BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN HPLC-DAD ile AYDINLATILMASI ve
BAKTERİYAL DNA-POLİMERAZ İNHİBİSYONLARI**

Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY danışmanlığında, Havva ER tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 21/07/2017 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı	Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY		
Üye	: Doç. Dr. Emre MENTEŞE		
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Halbay TURUMTAY		


Doç. Dr. Feriye KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

“*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze Çiçeğinin Ekstraktlarındaki Biyoaktif Bileşiklerin HPLC-DAD ile Aydınlatılması ve Bakteriyal DNA-Polimeraz İnhibisyonları” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans öğrenimim sırasında bana her türlü imkânı sunarak alanımda birçok tecrübe edinmemeye olanak sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Emine Akyüz Turumtay’a, her koşulda çalışmalarımızı destekleyip yol gösteren Doç. Dr. Cemal Sandallı’ya, başım sıkıştığında hiç çekinmeden gittiğim ve hiçbir zaman geri çevrilmediğim değerli hocalarım Adem Demir, Emine Kılıçkaya Selvi ve Emine Ülker’e, farklı laboratuvarlarda aynı projede birlikte ter döktüğümüz, her koşulda birbirimizi desteklediğimiz sevgili kardeşlerim Emine Esra Çınar, Ahmet Midilli ve Merve Koçbıyık’a, Kimya ve Biyoloji Bölümü ailesine ve Merkezi Laboratuvar ailesine sonsuz teşekkürler...

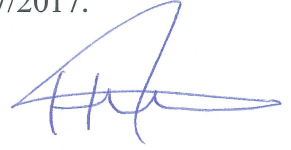
Teşekkürün en büyüğünü borç bildiğim, bana kattıkları insani ve ahlaki değerlerin yanında beni yaşamın her alanında koşulsuz destekleyip cesaretlendiren geniş aileme “AİLE CAN’dır” a bu tezi ithaf ediyorum...

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

Havva ER

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze Çiçeğinin Ekstraktlarındaki Biyoaktif Bileşiklerin HPLC-DAD ile Aydınlatılması ve Bakteriyal DNA-Polimeraz İnhibisyonları” 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. 21/07/2017.



HAVVA ER

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

ÖZET

***Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE ÇİÇEĞİNİN EKSTRAKTLARINDAKİ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN HPLC-DAD ile AYDINLATILMASI ve BAKTERİYAL DNA-POLİMERAZ İNHİBİSYONLARI**

Havva ER

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

Camellia sinensis (çay), yaprakları çay yapmak için kullanılan yaprak dökmeyen küçük ağaç türlerinden biridir. Bu bitkinin çiçekleri sonbahar ve kış mevsiminde çiçeklenir. Öncelikle çay çiçeği metanol ekstraktının Replikatif DNA polimerazlarında güçlü inhibisyon sergilediği gözlemlendi ve bu inhibisyonda aktif bileşiklerin bulunması için bu ekstrakt ardarda dietil eter, etil asetat ve n-butanol ile fraksiyonlandı. Üç organik fraksiyon ve geri kalan sulu kısım ve metanol ekstraktının asidik ve bazik hidrolize tabi tutulan fraksiyonlarının fenolik asit ve flavonoid içerikleri HPLC-DAD analizi ile araştırıldı ve spektrofotometrik olarak da antioksidan kapasite ve aktiviteleri belirlendi. Hidrolizli ekstraktlar haricindeki tüm ekstrakt ve fraksiyonların DNA polimeraz inhibisyonu ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlendi. Etil asetat ve butanol fraksiyonları *Bacillus subtilis*' den izole edilen Gram (+) replikatif DNA polimeraz III α (PolC) üzerinde güçlü inhibisyon gösterdi. Öte yandan, sulu fraksiyon hariç tüm fraksiyonlar ve metanol ekstraktı *Escherichia coli*' den izole edilen Gram (-) DNA polimeraz III α (DnaE) üzerinde güçlü inhibisyon gösterdi. HPLC-DAD analizlerine göre kateşin ve siringik asit etil asetat ekstraktında en yüksek iken, epikateşin, epigallokateşin gallat (EGCG), rutin ve luteolin türevleri en yüksek butanol ekstraktında tespit edildi. Methanol ekstraktının etil asetat fraksiyonu en iyi DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi ve en yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahiptir. Tüm ekstrakt ve fraksiyonlar içerisinde ise bazik hidrolizin organik fraksiyonunda en yüksek antioksidan kapasite ve aktivite tespit edildi. En yüksek toplam flavonoid içeriği ise asidik hidrolizin organik fraksiyonunda belirlendi.

2017, 71 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Camellia sinensis*, fenolik bileşikler, HPLC-DAD, DNA- polimeraz inhibisyonu

ABSTRACT

ILLUMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze FLOWER EXTRACTS BY HPLC-DAD AND THEIR INHIBITIONS OF BACTERIAL DNA POLYMERASE

Havva ER

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

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

Camellia sinensis (tea) is a species of evergreen small tree whose leaves are used to produce tea. Flowers of this plant was blossom in fall and winter seasons. First, it was observed that methanol extract of tea flower showed strong inhibition on replicative DNA polymerases and this extract was successively fractionated with diethyl ether, ethyl acetate and n-butanol in order to find these inhibitory of active compounds. The phenolic acid and flavonoid contents of the three organic and the remaining aqueous fractions of methanol extract and acidic and basic hydrolyzed fractions were investigated by HPLC-DAD analysis and their antioxidant activity and capacities were determined spectrophotometrically. DNA polymerase inhibition and antimicrobial activities of all extracts and fractions except hydrolyzed extracts were determined. Ethyl acetate and butanol fractions showed strong inhibition on Gram (+) replicative DNA polymerase III α (PolC) isolated from *Bacillus subtilis*. On the other hand, all fractions except for the aqueous fraction and the methanol extract showed strong inhibition on Gram (-) DNA polymerase III α (DnaE) isolated from *Escherichia coli*. According to HPLC-DAD analyzes, catechin and syringic acid were highest in ethyl acetate extract while epicatechin, epigallocatechin gallate (EGCG), routine and luteolin derivatives were detected in the highest butanol extract. The ethyl acetate fraction of the methanol extract has the best DPPH free radical scavenging activity and the highest total phenolic content. In all extracts and fractions, the highest antioxidant capacity and activity was detected in the organic fraction of basic hydrolysis. The highest total flavonoid content was determined in the organic fraction of acidic hydrolysis.

2017, 71 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Camellia sinensis*, phenolic compounds, HPLC-DAD, DNA- Polymerase inhibition

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Fenolik Bileşikler.....	2
1.2.1. Flavonoidler.....	3
1.2.2. Fenolik Asitler.....	7
1.2.3. Tanenler.....	9
1.2.4. Stilbenler.....	10
1.2.5. Kumarinler.....	10
1.3. <i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze (Theaceae).....	11
1.4. Ekstraksiyon.....	13
1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	16
1.6. Spektrofotometrik Yöntemlerle Fenolik Bileşiklerin Tayini.....	22
1.6.1. Folin Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Fenol İçeriğini Belirleme.....	22
1.6.2. Toplam Flavonoid İçeriğini Belirleme.....	23
1.6.3. DPPH• Serbest Radikal Temizleme ile Antioksidan Aktivite Belirleme.....	25
1.7. Ekstraktların DNA Polimeraz Enzim Üzerindeki İnhibisyonları.....	26
1.7.1. DNA Polimerazlar.....	26
1.7.2. C Familyası DNA Polimerazlar (PolIII α).....	27
1.8. Literatür Özeti.....	28
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
2.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller.....	31
2.2. Bitkilerin Toplanması.....	31
2.3. Çay Çiçeğinin Ekstraksiyonu.....	32
2.4. Çay Çiçeği Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri.....	33
2.4.1. HPLC-DAD Koşulları.....	33

2.4.2.	Standartlar, Validasyon ve Kalibrasyon	34
2.5.	Toplam Antioksidan Bileşiklerin Belirlenmesi.....	34
2.5.1.	Toplam Polifenol İçeriği (TP)	34
2.5.2.	Toplam Flavonoid İçeriği (TF).....	35
2.6.	Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi.....	36
2.7.	Ekstraktların DNA Polimerazlar Üzerindeki İnhibisyonları.....	36
2.7.1.	DnaE ve PolC' nin Saflaştırılması.....	36
2.7.2.	Primer Uzatma Deneyi	37
2.8.	Antimikrobiyal Aktivite Deneyinin Yapılışı.....	37
3.	BULGULAR	39
3.1.	Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Metot Optimizasyonu.....	39
3.2.	Çay Çiçeği Ekstraktlarındaki Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri.....	40
3.3.	Toplam Antioksidan Bileşiklerin Aktivitesi ve Tayini.....	52
3.4.	Çay Çiçeği Ekstraktlarının DNA Polimeraz Enzim İnhibisyonu.....	54
3.5.	Çay Çiçeği Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	54
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ	56
5.	ÖNERİLER	60
	KAYNAKLAR.....	61
	ÖZGEÇMİŞ.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	3
Şekil 2. Difetil propan yapısı	4
Şekil 3. Flavan (A) ve Flavon (B) yapısı.....	4
Şekil 4. Flavanollerin yapısı ve örnek bileşikler	5
Şekil 5. Flavonların yapısı ve örnek bileşikler	5
Şekil 6. Flavanonların yapısı ve örnek bileşikler	6
Şekil 7. İzoflavonların yapısı ve örnek bileşikler	6
Şekil 8. Flavonollerin yapısı ve örnek bileşikler	7
Şekil 9. Antosiyanidinlerin yapısı ve örnek bileşikler.....	7
Şekil 10. Hidroksibenzoik asitlerin yapısı ve örnek bileşikler	8
Şekil 11. Hidroksisünamik asitlerin yapısı ve örnek bileşikler	8
Şekil 12. Örnek kondense tanen yapısı.....	9
Şekil 13. <i>Trans</i> Resveratrol (<i>Trans</i> -R) ve <i>Cis</i> Resveratrol (<i>Cis</i> -R) yapıları	10
Şekil 14. Kumarinlerin genel yapısı ve örnek bileşikler	11
Şekil 15. Çayın Türkiye coğrafyası üzerinde dağılımı	11
Şekil 16. Çay çiçeği	12
Şekil 17. HPLC cihazının şematik gösterimi (URL-2, 2017).....	16
Şekil 18. Diyot dizisi UV dedektörü	19
Şekil 19. Gallik asit' in Folin-Ciocalteu reaktifıyla etkileşimi	23
Şekil 20. Metanolik AlCl ₃ çözeltisinde Flavanoid-Al kompleksinin oluşumu	24
Şekil 21. Kateşinlerin NaNO ₂ varlığında Al (III) ile kompleksleşme reaksiyonu	25
Şekil 22. DPPH• radikalinin andioksidan bileşikle reaksiyonu.....	26
Şekil 23. 5'-ucundan Cy5 ile florojenik işaretli çift zincir sentetik DNA kalıbı.....	37
Şekil 24. Fenolik standartların (1 mg.L ⁻¹) HPLC-DAD kromatogramı	39
Şekil 25. Metanol ekstraktının (FM) 280 nm' deki kromatogramı	44
Şekil 26. Kateşin türevlerinin (Kateşin T.) UV spektrumu (200-400 nm)	44
Şekil 27. Luteolin türevlerinin (Luteolin T.) UV spektrumu (200-400 nm)	45
Şekil 28. Eter fraksiyonunun (FE) 280 nm'deki kromatogramı	45
Şekil 29. Etilasetat fraksiyonunun (FEa) 280 nm'deki kromatogramı	46

Şekil 30. Bütanol fraksiyonunun (FB) 280 nm'deki kromatogramı.....	46
Şekil 31. Sulu fraksiyonun (FW) 280 nm'deki kromatogramı.....	47
Şekil 32. Asidik hidroliz organik fraksiyonunun (FAO) 280 nm'deki kromatogramı...	49
Şekil 33. Asidik hidroliz sulu fraksiyonunun (FAW) 254 nm' deki kromatogramı.....	50
Şekil 34. Bazik hidroliz organik fraksiyonunun (FBO) 315 nm' deki kromatogramı ..	51
Şekil 35. Bazik hidroliz sulu fraksiyonunun (FBW) 315 nm' deki kromatogramı	51
Şekil 36. Çay çiçeğinin DNA polimeraz üzerindeki inhibisyon sonucu	54
Şekil 37. Rutin' in Kuersetin' e parçalanması.....	57
Şekil 38. EGCG' tan gallik asit' in ayrılması reaksiyonu	58
Şekil 39. Flavonol ve Flavan-3-ol genel yapıları	58



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Çay çeşitlerinin farklı kanser türleri üzerindeki etkisi.....	13
Tablo 2. Polifenollerin ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler.....	15
Tablo 3. Farklı fenolik bileşiklerin ayrılması için HPLC parametreleri.....	21
Tablo 4. Fenolik standartların kalibrasyon ve validasyon parametreleri.....	40
Tablo 5. Katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraktlarının HPLC-DAD analiz sonuçları.....	41
Tablo 6. HPLC-DAD analizinde düşük alana sahip olan bileşiklerin miktarları.....	42
Tablo 7. Bilinmeyen piklerin gallik asit ya da kuersetin eşdeğeri cinsinden miktarları.....	43
Tablo 8. Asidik ve bazik hidroliz fraksiyonlarının HPLC-DAD analizi sonuçları.....	48
Tablo 9. Bilinmeyenlerin eşdeğer gram cinsinden miktarı.....	49
Tablo 10. TP içeriği, TF içeriği ve DPPH radikal temizleme aktivite sonuçları.....	53
Tablo 11. Çay çiçeğinin farklı ekstraktlar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri.....	55
Tablo 12. Sıvı- sıvı ekstraksiyonun HPLC- DAD ile Spektrofotometrik analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	56
Tablo 13. Hidroliz ekstraksiyonlarının HPLC-DAD ile Spektrofotometrik analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	57

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

C18	Oktadesil
nHPLC	Normal 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
N	Normalite
nm	Nanometre
UV	Ultraviöle
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EPA	U. S. Environmental Protection Agency
Std	Standart
GC	Gaz Kromatografisi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektroskopisi
UHPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
λ	Dalga Boyu
T	Sıcaklık
μm	Mikro Molar
mg	Mili Gram
L	Litre
ACN	Asetonitril
EEa	Etilasetat

AA	Asetik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
LPO	Lipid Peroksidasyonu
BSA	Bovine Serum Albumin
DTT	Dithiothreitol
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
HEPES	N-2-hidroksietilpiperazine-N-2-ethan sulfonik asid
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
DMSO	Dimetil Sulfoksit
EGCG	Epigallokateşin Gallat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
DnaE	<i>E.coli</i> DNA polimeraz III proteini
PolC	<i>B.subtilis</i> DNA polimeraz III proteini
RT	Alıkonma Zamanı
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yaşam standartlarının yükselmesi, tüketicilerin satın aldıkları gıdaların niteliklerini ve sağlık etkilerini sorgulamaya başlamaları, kronik kalp rahatsızlıkları ve kanser gibi hastalıklardan dolayı ölüm oranlarının artması, araştırmacıları sigara, alkol stres gibi risk faktörlerinin yanı sıra, tüketilen gıdaları da mercek altına almaya zorunlu kılmıştır. Nüfusla doğrusal olarak artan talebi karşılamak için gıdaların üretim aşamalarında verimi artırmak ve uzun süre depolanabilmelerini sağlamak amacıyla pek çok kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu şekilde üretilen ve depolanan gıdaların zamanla pek çok hastalığa sebep oldukları gözlenmiştir. Ne ilginçtir ki doğası bozulduğu için hastalıklara neden olan bu gıdaların yan etkilerinin giderilmesi için araştırılan şifa kaynaklarının bu gıdaların doğal olarak üretilenlerinde saklı olduğu keşfedilmiştir. Metabolik faaliyetler sırasında oksijen, reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan süperoksit, hidrojen peroksit, tekli (singlet) oksijen ve hidroksil radikallerine çevrilebilir (McCord., 2000). Serbest radikaller dış orbitallerinde bir ve ya daha fazla ortaklaşmamış elektron içeren ve bu nedenle oldukça reaktif olan moleküllerdir. Reaktif oksijen türlerinin metabolizmada olumlu pek çok önemli rollerinin yanı sıra organizmalar, metabolik yollarla vücutta üretilen serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı kendilerini korumak için çeşitli antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Ancak reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikallerin vücutta dengesiz çoğalmaları DNA, protein ve yağlar gibi makro moleküllerle bozucu reaksiyonları sonucunda çeşitli hastalıklara sebep olur. Antioksidanlar, hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterir ve serbest radikalleri daha az reaktif türlere dönüştürür. Böylece serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu, proteinlerin çapraz bağlanması ve DNA mutasyonu engellenir (Başer, 2002). Antioksidanlar, dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirir:

- Temizleme (Scavenging) etkisi: Oksidanları zayıf aktif bir moleküle dönüştürme şeklinde meydana gelmektedir.

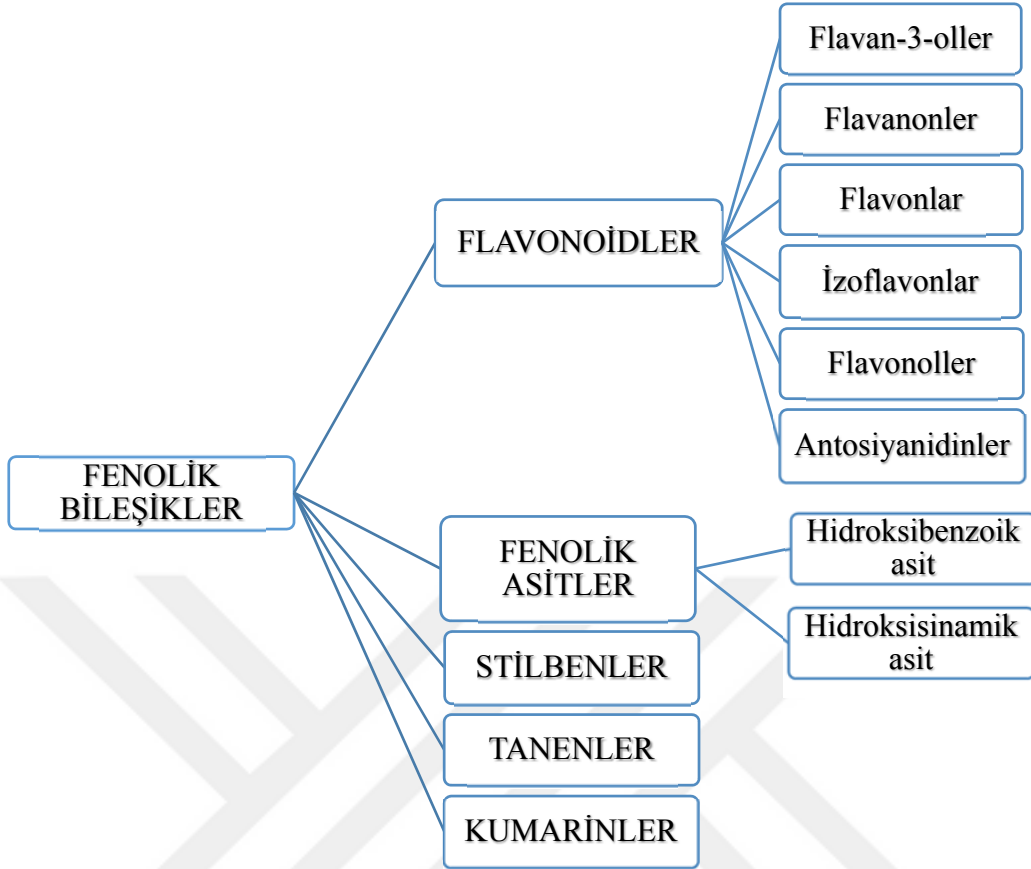
- Baskılama (Quenching) etkisi: Bu etki, oksidan maddelere bir hidrojen aktararak reaktif olmayan formuna dönüştürme şeklinde olmaktadır ve çoğunlukla flavonoidler tarafından yapılmaktadır.
- Onarma etkisi: Oksidanların oluşturduğu hasarı ortadan kaldırma şeklinde etki göstermektedirler.
- Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen bu etki hemoglobin ve E vitamini tarafından yapılır.

Fenolik bileşiklerin antioksidan madde olarak rol almaları, fenolik bileşik içeren doğal bileşenlerin çeşitli ürün formülasyonlarına girmesini ve fonksiyonel gıda geliştirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmalarını sağlamıştır (Memişoğulları, 2005).

1.2. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler; bitkilerde sekonder metabolit olarak üretilen ve antioksidan özelliğe sahip olan moleküllerdir. Çoğunlukla suda çözünürler. Fenolikler, bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan bir veya daha fazla aromatik halkaya sahip olan bileşiklerdir. Yapılarında ki farklılıklara rağmen fenolik bileşikler polifenoller olarak da adlandırılmaktadırlar (Balasundram vd., 2006).

Farklı doğal ürünlerden, flavonoidleri, fenolik asitleri, kumarinleri, stilbenleri ve taninleri içeren sekiz binin üzerinde fenolik bileşik izole edilmiştir (Erdman, 2007). Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir. Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Coşkun, 2006; Aydın ve Üstün, 2007). Her bir grup, kimyasal yapısına göre kendi içinde alt gruplara bölünür. Bu gruplama Şekil 1' de gösterilmiştir (Erdman, 2007).



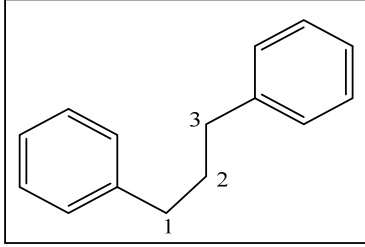
Şekil 1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Bu bileşenler, antiviral, anti-alerjik, anti-inflamatuar, antikarsinojen, anti diyabetik etkiyi kapsayan geniş bir biyolojik etki aralığı sergiler. Buna ek olarak hücre yaşlanması ve ateroskleroz gibi kronik hastalıklarla ilişkili olan serbest radikalleri, lipid peroksidasyonunu (LPO), kılcal geçirgenliği ve kırılabilirliği gibi etkileri olan enzim sistemlerinin aktivitesini inhibe eder. (Torel vd., 1986; Ratty and Das, 1988; Yuting vd., 1990; Mora vd., 1990; ; Hanasaki vd., 1994; Bravo, 1998; Meral vd., 2012).

1.2.1. Flavonoidler

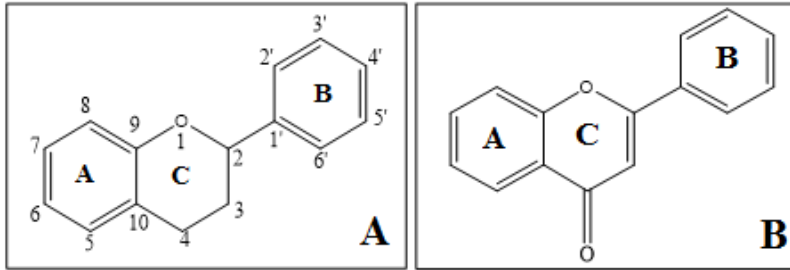
Flavonoidler serbest radikal yakalayıcısı olmaları, enzim aktivitelerini düzenlemeleri, antibiyotik, antialerjen, antidiyaretik, antiülser ve antiinflamatuvar ilaç gibi hareket etmeleri nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Rice-Evans vd., 1996).

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşur ve 15 karbon atomu içeren difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısını teşkil eder. (Şekil 2.)



Şekil 2. Difenil propan yapısı

Difenil propan yapısı oksijen ile üç halkalı yapıya sahip olan flavan ve flavonları oluşturur. Genellikle flavan türevlerine flavanoidler, flavon türevlerine ise flavonoidler denir. Flavan ve flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C ile gösterilir. A ve C halkalarındaki karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. B halkasındaki atomlar ise, üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Guliyev ve Harmandar, 2003) (Şekil 3).

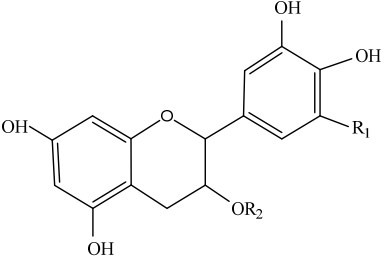


Şekil 3. Flavan (A) ve Flavon (B) yapısı

A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları bulunur (Saldamlı, 2007). Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır (Rice-Evans vd., 1997). Flavonoidler karbon halkasının yapısının oksidasyon seviyesine bağlı olarak 14 sınıfa ayrılmaktadır. Fakat temel flavonoidler içerdikleri karbon halkasındaki değişimlere göre altı ana gruba ayrılmaktadırlar (Yılmaz and Toledo, 2006). Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir (Saldamlı, 2007).

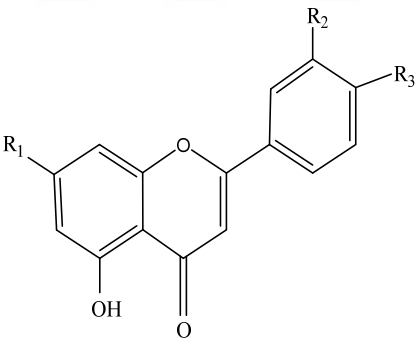
Bu alt gruplardan flavan-3-ollerin (flavanoller) en önemlileri kateşin ve epikateşin olup bu bileşiklerin gallik asit ile kombinasyonları sonucu gallatları oluşur. Bu

bileşikler çoğunlukla yeşil çay, kırmızı şarap, beyaz şarap, şeftali ve elmada bulunurlar (Peterson, vd., 1998) (Şekil 4).

 <p>Flavanoller</p>	Flavan-3-oller	R₁	R₂
	Kateşin	H	H
	Epikateşin	H	H
	EGC	OH	H
	ECG	H	Gallat
	EGCG	OH	Gallat

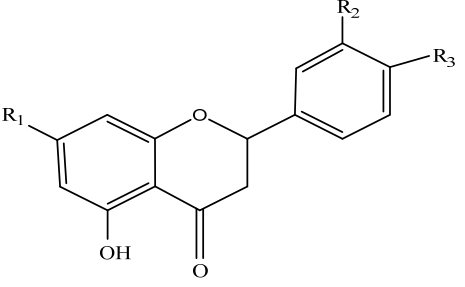
Şekil 4. Flavanollerin yapısı ve örnek bileşikler

Flavon sınıfına ait temel bileşikler apigenin, luteolin ve krisindir. Maydanoz, kereviz ve zeytinde bol miktarda bulunmaktadır. Yüksek derişimlerde bulduklarında ya da metal iyonları ile kompleks oluşturdıklarında bitkiye renk vermekteler (Peterson, vd., 1998) (Şekil 5).

 <p>Flavonlar</p>	Flavonlar	R₁	R₂	R₃
	Luteolin	OH	OH	OH
	Apigenin	OH	H	OH
	Krisin	OH	H	H
	Genkwanin	OCH ₃	H	OH

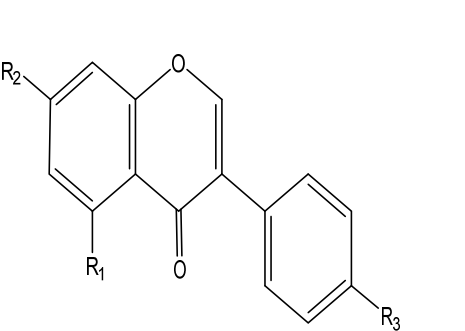
Şekil 5. Flavonların yapısı ve örnek bileşikler

Flavonların dihidro türevleri ise flavanonlardır. Greyfurt ve portakalda bol miktarda bulunurlar (Clifford, 2000). Greyfurtlarda acı tadı veren naringin bir flavanon glikozittir (Cemeroğlu, 2004) (Şekil 6).

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

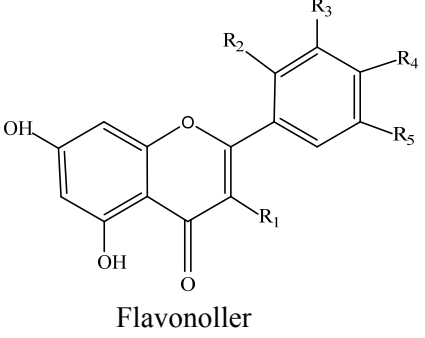
Şekil 6. Flavanonların yapısı ve örnek bileşikler

Flavonların B halkasının propan zincirine C-3 pozisyonuna bağlanması nedeniyle, izoflavonoid alt sınıfı oluşur. İzoflavonoidler bazı meyve ve sebzelerde, başta soya fasulyesi olmak üzere çeşitli baklagillerde bulunan bileşiklerdir. İnsan östrojen hormonuna yapısal benzerliklerinden dolayı östrojenik özelliklere sahiptirler. Son yıllardaki klinik çalışmalar izoflavonoidlerin biyoaktif bileşikler olduklarını ve soya proteinleri ile birlikte kandaki kolesterol düzeyinin düşürülmesinde önemli rolleri olduğunu ortaya koymuştur. En yaygın daidzein ve genistin izoflavonlarıdır (Şekil 7) (Miadokova., 2009).

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

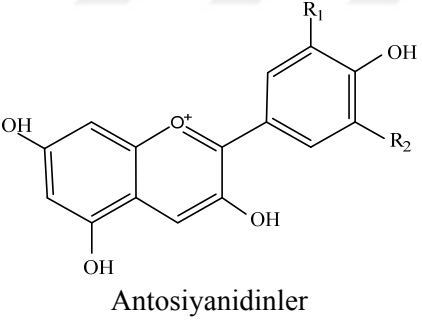
Şekil 7. İzoflavonların yapısı ve örnek bileşikler

Flavonoidlerin en yaygın sınıfı flavonollerdir ve en önemli bileşikleri kuersetin, rutin, kamferol ve mirisetindir (Peterson, vd., 1998) (Şekil 8).

 <p>Flavonoller</p>	Flavonoller	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅
	Rutin	3-O-Rha-glu	H	OH	OH	H
	Kaemferol	OH	H	H	OH	H
	Kuersetin	OH	H	OH	OH	H
	Mirisetin	OH	H	OH	OH	OH
	Fisetin	OH	H	H	OH	OH

Şekil 8. Flavonollerin yapısı ve örnek bileşikler

Antosiyaninler, çiçek, meyve ve sebzelerde bulunan ve bitkilere kırmızı, mavi ve mor renk veren pigmentlerdir. Üzüm ve kıvılcık gibi meyvelerde yüksek oranda bulunan antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleridir. Bitkilere verdikleri renk tonu ve yapıları pH ve ko-pigmentlere bağlı olarak değişmektedir (Clifford, 2000) (Şekil 9).

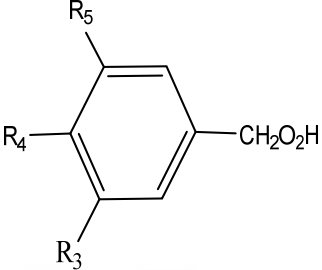
 <p>Antosiyanidinler</p>	Antosiyanidinler	R₁	R₂
	Pelargonidin	H	H
	Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
	Delphinidin	OH	OH
	Siyanidin	OH	H

Şekil 9. Antosiyanidinlerin yapısı ve örnek bileşikler

1.2.2. Fenolik Asitler

Bitkilerdeki en basit fenolik bileşenler olan fenolik asitler, bitkilerde serbest ve bağlı formlarda bulunabilen diyet fenollerinin yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır. Hidroksibenzoik asit ve hidroksisünamik asit olmak üzere iki alt gruptan oluşur ve flavonoidlerin sentezinde öncül bileşiklerdir (Du vd., 2008).

Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısında olup, en yaygın olanları gallik asit (3,4,5 trihidroksil benzoik asit), *p*-hidroksibenzoik asit (*p*-OH benzoik asit), protokatekuik asit, sirinjik asit ve vanilik asit gibi asitlerdir (Peterson ve Dwyer, 1998). Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları ve örnek bileşikleri Şekil 10’ da verilmiştir.

 Hidroksibenzoik Asitler	Hidroksibenzoik Asitler	R ₃	R ₄	R ₅
	<i>p</i> -OH benzoik asit	H	OH	H
Protokatekuik asit	OH	OH	H	
Vanilik asit	OCH ₃	OH	H	
Sirinjik asit	OCH ₃	OH	OCH ₃	
Gallik asit	OH	OH	OH	

Şekil 10. Hidroksibenzoik asitlerin yapısı ve örnek bileşikler

Diğer taraftan en yaygın temsilcileri kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve sinapik asit olan hidroksisünamik asitler C6-C3 fenilpropan yapısında olan aromatik bileşiklerdir (Ignat vd., 2011). Hidroksisünamik asitlerin kimyasal yapıları ve örnek bileşikleri Şekil 11’ de verilmiştir.

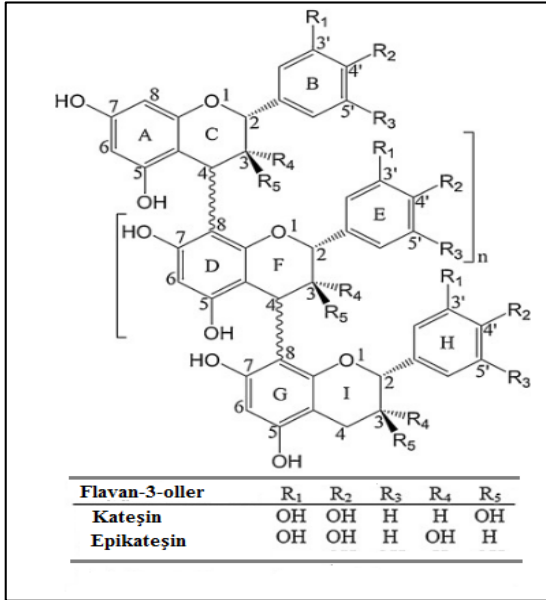
 Hidroksisünamik Asitler	Hidroksisünamik Asitler	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
	<i>o</i> -kumarik asit	OH	H	H	H
<i>p</i> -kumarik asit	H	H	OH	H	
Kafeik asit	H	OH	OH	H	
Ferulik asit	H	OCH ₃	OH	H	
Sinapik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	

Şekil 11. Hidroksisünamik asitlerin yapısı ve örnek bileşikler

Bağlı fenolik asitler, ester, eter veya asetal bağlar yoluyla çeşitli bitki bileşenlerine bağlanabilir. Fenolik asitler, farklı ekstraksiyon koşullarına ve bozulmaya karşı farklı duyarlılıklara göre değişen uygun formlarında bulunurlar (Ignat vd., 2011).

1.2.3. Tanenler

Fenoliklerin üçüncü önemli grubunu teşkil eden nispeten yüksek moleküllü bileşikler olan tanenler, hidroliz edilen ve kondense tanenler olarak alt gruplara ayrılabilirler (Porter, 1989 ; Ignat vd., 2011). Proantosiyanidinler, kondense tanenler grubunda olan polimerik flavonoidlerdir. Flavonoid sentezi için biyosentetik yolların iyi bilinmesine rağmen, polimerizasyon basamakları henüz aydınlatılamamıştır. En yaygın olarak incelenen kondense tanenler, flavan-3-ollerden (-)-epikateşin ve (+)-kateşinin polimerizasyonuna dayanır (Şekil 12).



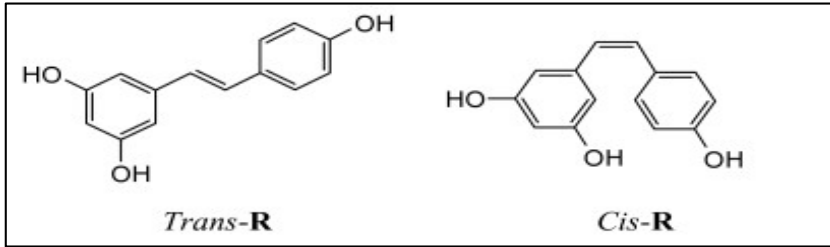
Şekil 12. Örnek kondense tanen yapısı

Hidrolize edilebilir tanenler, gallik asit türevleridir. Gallik asit çekirdek bir poliolüne esterleştirilir ve daha kompleks hidrolize edilebilir tanenler daha çok esterleşmiş ya da oksidatif çapraz bağlı galloil grupları ile elde edilebilir (Ignat vd., 2011).

Tanenler potansiyel metal iyonu bağlayıcı, protein çöktürücü ve biyolojik antioksidan oldukları için biyolojik sistemler üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Tanenlerin muazzam yapısal çeşitlilikleri ve oynayabileceği çeşitli biyolojik rollerden dolayı herhangi bir sistemdeki etkilerinin doğru bir şekilde tahmin edilmesini sağlayacak modeller geliştirmek zordur (Ignat vd., 2011).

1.2.4. Stilbenler

Bitkiler strese, hasara, enfeksiyona veya UV ışımaya maruz kaldığında, hastalık direncini artırmak için stilbenleri sentezlerler (Giachetti vd., 1999; Bavaresco, 2003). Dut, üzüm, çilek, yer fıstığı ve şarap stilbenleri içeren en önemli beslenme kaynağı olup bu bileşikler 70' ten fazla bitki türünde tespit edilmiştir (Bavaresco, 2003). Stilben monomerleri arasında, trans-resveratrol (Şekil 13), şarapta düşük konsantrasyonda bulunmasına rağmen (1-3 mg mL⁻¹), insan sağlığı üzerine etkisi nedeniyle en fazla incelenen bileşiktir (Vitrac vd., 2005).

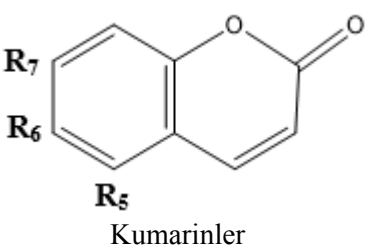


Şekil 13. *Trans* Resveratrol (*Trans-R*) ve *Cis* Resveratrol (*Cis-R*) yapıları

1.2.5. Kumarinler

Kumarin bitkilerde yaygın olarak bulunan ve benzo- α -piron grubunun ana bileşiği olan kumarin, ilk defa 1820'de Vogel tarafından tonka baklası (*Dipteryx odorata*) adı verilen ağacın tohumlarından izole edilmiştir. Kumarinin yapısı hakkında çeşitli kimyasal yapılar önerilmiş olup ilk doğru yapı Strecker (1867) ve Fitting (1868) tarafından ortaya konulmuştur (Sethna ve Shah 1944).

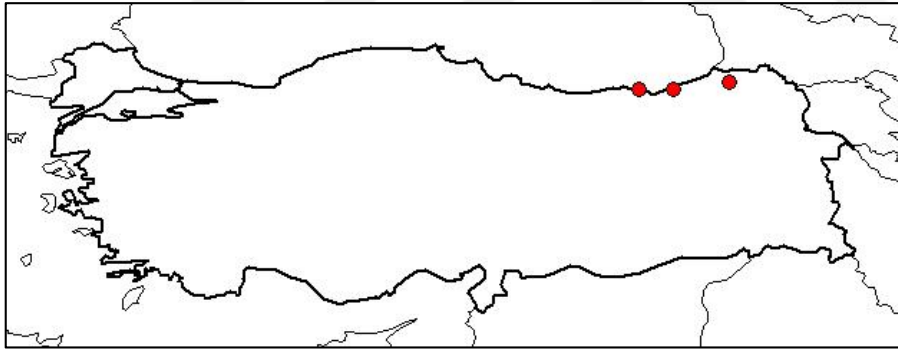
Kumarinlerin benzen halkasına değişik sübstitüentlerin bağlanmasıyla mono-, di-, tri sübstitüe kumarinler meydana gelir. Kumarinlerin genel yapısı ve üzerinde sübstitüent grup taşıyan kumarinler Şekil 14' te gösterilmiştir.

 <p>Kumarinler</p>	Kumarinler	R₅	R₆	R₇
	7-hidroksikumarin	H	H	OH
	6,7-dihidroksikumarin	H	OH	OH
	6- hidroksi- 5,7- dimetoksikumarin	OCH ₃	OH	OCH ₃

Şekil 14. Kumarinlerin genel yapısı ve örnek bileşikler

1.3. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Theaceae)

Çay bitkisi botanikte Angiospermae (çiçek açanlar) bölümünden, Dicotyledonea (iki çenekliler) sınıfından ve Theaceae (çaygiller) ya da *Camellia* familyasındandır. Botanikçiler tarafından genel olarak kabul edilen ismi *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze'dir. Çok yıllık bir bitki olan çayın ülkemizdeki yayılışı Şekil 15'de görüldüğü gibi Rize, Artvin ve Trabzon illerindedir (URL-4, 2017).



Şekil 15. Çayın Türkiye coğrafyası üzerinde dağılımı

Çay çiçeğinin tomurcukları küçük kürecikler beyaz renkli hafifçe güzel kokulu ve ortalama 3 cm çapındadır (Şekil 16). Çay bitkisinin çiçek tomurcukları iklim şartlarına bağlı olarak Haziran sonu ve Temmuz ayının başlarında oluşur. Erken çiçek Ağustos ayının ortalarında görünür. En çok Ekim ve Kasım aylarında çiçek görünür. Çiçeklenme Aralık ayı sonu itibari ile tamamen sona erer (URL-3, 2017).



Şekil 16. Çay çiçeği

Çayın kanser üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada değişik çay çeşitlerinin farklı kanser türleri üzerinde elde edilen etkileri Tablo 1' de gösterilmiştir (Trevisanato ve Young-In Kim, 2000).

Günümüze kadar çay bitkisinin en çok içeriği incelenen kısmı içecek üretiminde kullanılan yaprak kısmıdır ve bu kısım kateşinlerce zengin olup bu bileşiklerin çay kateşinleri diye adlandırılmasına sebep olmuştur. Bu tez kapsamında replicative DNA polimeraz enzimlerine karşı inhibisyonu gözlenen çay çiçeğinin bu inhibisyona sebep olan bileşikleri araştırıldı. Bu kapsamda çay kateşinlerinden yola çıkarak polifenollerin ekstraksiyonuna uygun çözücüler kullanıldı. Genel olarak çay kateşinleri için %70-80 oranlarında etanol kullanılmaktadır. Polifenollerin dayanıklılığı dikkate alındığında etanol yerine metanolün çözücü olarak kullanılmasına karar verildi. Polifenollerin çay çiçeğinde ekstraksiyonu için bir seri yöntem kullanıldı.

Tablo 1. Çay çeşitlerinin farklı kanser türleri üzerindeki etkisi

ÇAY TİPİ	YER	ETKİSİ	KAYNAK
Yeşil çay	Ağız	6 ay uygulamadan sonra lezyonlarda % 37,9 kısmi azalma	Li vd., 1999
Siyah çay	Deri	Farelerle yapılan çalışmada, çay+UV ışın uygulanan grupta su+UV ışın verilen gruba göre % 30-42 daha az keratoakantoma ve % 26-33'den daha az squamus deri tümörü	Conney vd., 1999
Yeşil çay Siyah çay	Mide	Günde 7 fincan veya daha fazla yeşil çay tüketenlerde kanser riskinde % 31'e varan azalma	Inoue vd., 1998
Yeşil çay	Pankreas	200 g/ay'a kadar tüketen erkeklerde kanser riskinde % 12, kadınlarda % 53; 200 g/ay'dan fazla tüketen erkeklerde % 43, kadınlarda % 47 azalma	Ji vd., 1997
Siyah çay	Akciğer	Farelerle yapılan çalışmada, çay + 4 metil nitrozamin-1-(3-piridil)-1-bütanon uygulanan grupta su+ 4-metilnitrozamin-1-(3-piridil)-1-bütanon uygulanan gruba göre tümör oluşumunda % 24 azalma, mevcut tümör boyutlarında % 38 küçülme	Yang vd., 1997

1.4. Ekstraksiyon

Son yıllarda doğal ürünlerden ortaya çıkan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonuna ilişkin çalışmalar özel bir ilgiye sahiptir (Pinelo vd., 2005). Ekstraksiyon, fenolik bileşiklerin izolasyonunda, tanımlanmasında ve kullanımında çok önemli bir adımdır ve tekli ve standart bir ekstraksiyon yöntemi yoktur. Katı sıvı ekstraksiyonu, sıvı sıvı ekstraksiyonu, soxhlet ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli çözücü ekstraksiyonu, ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu ve süper kritik sıvı ekstraksiyonu yöntemlerinden biri ya da bir kaçını beraber kullanılabilir. Süperkritik sıvı ile ekstraksiyon ve çözücü ekstraksiyonu fenolik bileşiklerin izolasyonu için en sık kullanılan tekniklerdir (Bleve vd., 2008). Literatürde çok sayıda makale, meyveler, sebzeler, şaraplar, kahve, çay, otlar, tahıllar ve fasulye gibi bakliyat ürünleri de dahil

olmak üzere bitki kaynaklı maddelerden polifenollerin ekstraksiyonu ve analizi üzerine odaklanmaktadır (Balasundram vd., 2006).

Fenolik bileşikler, genellikle öğütülen bitki örneğinin çözücü ile ıslatılmasıyla ekstrakte edilmiştir (Merken ve Beecher, 2000). Bu basit çözücü ekstraksiyonu, şekerler, organik asitler ve proteinler gibi fenolik olmayan maddelerin birlikte ekstraksiyonunu içerir ve daha sonra ilave saflaştırma işlemleri gerektirir (Castañeda-Ovando vd., 2009). Çözücü ekstraksiyonu, biyokütle durumuna bağlı olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu veya katı-sıvı ekstraksiyonu olabilir.

Katı-sıvı ekstraksiyonu, katı bir örnekteki bileşenlerin çözücüye göç ettiği kütle transferi olarak tanımlanabilir. Kütle transferi, örneğin mümkün olduğunca küçük partiküllere küçültülmesi ile yüzey alanının genişletilmesi, sıcaklık ve ardışık olarak taze çözücü kullanılması ile artırılabilir (Pinelo vd., 2004; Corrales vd., 2009).

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, başlangıçta bir veya daha fazla çözelti içeren bir sıvı solüsyonun karışmayan veya neredeyse karışmayan bir sıvı (çözücü) ile iyice karıştırıldığı bir kütle transferi işlemidir. Farklı yoğunluğa sahip çözücü, örnekteki bileşenlerden birine veya daha fazlasına tercihli seçicilik sergiler. Böylece çözücü, seçici olarak ilgili bileşenleri içinde buldukları çözeltiden izole eder (Ignat vd., 2011). Eğer uygun bir ekstraksiyon çözücüsü seçilirse, çok etkili bir ekstraksiyon gerçekleşir.

Ekstraksiyonda, ekstraktantlar olarak kullanılan en yaygın çözücüler asitli ya da asitsiz metanol ve etanoldür (Amr ve Al-Tamimi, 2007). Bu yöntemlerden metanol ekstraksiyonu daha etkilidir fakat metanolün toksitesinden dolayı gıda endüstrisinde etanol tercih edilmektedir (Castañeda-Ovando vd., 2009).

Literatürde metanol ve etanol ekstraksiyonlarının arasında çok sayıda diğer ekstraksiyon çözücüleri belirtilmiştir (Tablo 2) (Ignat vd., 2011).

Tablo 2. Polifenollerin ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler

Polifenolik Bileşikler	Çözücü	Kaynak
Fenolik asitler, Flavonollar, Antosiyaninler	Etil asetat	Pinelo vd., (2005); Russell vd., (2008)
Antosiyaninler, Fenolik asitler, Kateşinler, Flavanonlar, Flavonlar, Flavonollar, Proantosiyandinler	Metanol ve farklı sulu formları (10–90%, v/v)	Bleve vd., (2008); Caridi vd., (2007); Ross vd., (2009); Mattila ve Kumpulainen, (2002)
Antosiyaninler, Flavonollar, Serbest fenolik asitler	Etanol ve farklı sulu formları (10–90%, v/v)	Balas ve Popa (2007); Wang vd., (2009); Bleve vd., (2008)
Flavonollar, Serbest fenolik asitler	Kloroform	Sharififar vd., (2009)
Flavonollar, Fenolik asitler	Dietil eter	Ross vd., (2009)
Proantosiyandinler, Fenolik asitler	Sıcak su (80–100°C)	Diouf vd., (2009)
Bağlı fenolik asitler, Tanenler	NaOH (2N-10N)	Nardini vd., (2002); Popa vd., (2008); Ross vd., (2009)
Fenolik bileşikler, Fenolik asitler	Petrol eteri	Zhang vd., (2009)
Flavonollar, Fenolik asitler, Hidroksisinamik asitler, Kumarinler	Aseton/su 10–90% (v/v)	Naczk ve Shahidi (2006); Sharififar vd., (2008); Schieber vd., (2003)
Flavonollar, Fenolik asitler, Antosiyaninler	n-Hekzan, İzooktan, Etil asetat	Garcia vd., (2004)

Fenolik asitlerin aynı zamanda, ester ve glikozidik bağlar vasıtasıyla hücre duvarı polimerlerine bağlanan ve organik çözücüler tarafından çözünmeyen bağlanmış kompleksleri mevcuttur. Bağlı fenolik asitler, baz hidrolizi, asit hidrolizi veya her ikisinin de kullanımıyla bağlı formdan kurtarılır (Mattila ve Kumpulainen, 2002). Baz

hidrolizi sonrasında, daha önce hidrolize edilmemiş bağlı fenolikleri serbest bırakmak için bazen asit hidrolizi gerçekleştirilir (Ross vd., 2009).

1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kısaca HPLC olarak adlandırılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir. HPLC ünitesi, Şekil 17’de gösterildiği gibi hareketli faz, pompa, örnekleyici (enjektör), kolon (ve kolon fırını) dedektör ve data işleyici kısımlarından oluşmaktadır (URL-1, 2017).



Şekil 17. HPLC cihazının şematik gösterimi (URL-2, 2017)

Bilgisayar kontrollü tanımlanmış bir programa göre pompa, sabit (izokratik elüsyon) veya değişen (gradient elüsyon) bileşimden oluşan bir hareketli fazın doğru bir şekilde yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, degazörden hareketli fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderirken bu işlemi akış hızını ayarlayarak gerçekleştirir. Akış hızı aralıklarına göre pompalar analitik, yarı-Preparatif ve Preparatif olarak gruplandırılabilir. Analitik pompalar genellikle 0,1-5mL akış değerleri arasında kullanılır. Günümüzde ultra ve nano basınçlı pompaların kullanılmaya başlamasıyla, HPLC sistemleri UHPLC ve nHPLC gibi isimlendirilmektedir. Kolon boyutları, sabit fazın partikül boyutu, akış hızı ve hareketli

faz kompozisyonu gibi bir dizi faktöre bağılı olarak, 42000 kPa'ya (yaklaşık 6000 psi) kadar çalışma basıncı üretilebilir (URL-1, 2017).

Analiti taşıyan hareketli (mobil) fazdır ve genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, bunların metanol ve/veya asetonitril ile oluşturulan çözeltileri veya organik çözücülerden oluşur. Mobil fazın bileşimi ve pH değeri ayırımı direkt etkiler, kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre hareketli faz seçilmelidir (URL-1, 2017).

Kolon (sabit faz) maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Genellikle çelik, PEEK ve camdan imal edilen kolonların uzunluğu 50-300 mm arasında olup iç çapı 2-5 mm arasındadır. İç çapları 2 mm'den küçük kolonlara çoğunlukla mikro gözenekli kolonlar denir. Genellikle 3 ila 10 µm'lik bir parçacık boyutuna sahip silika veya polimer gibi sabit bir fazla doldurulur. İdeal olarak, bir analiz sırasında hareketli fazın ve kolonun sıcaklığı sabit tutulmalıdır. Çoğu ayırma ortam sıcaklığında yapılır, ancak kolondan daha iyi bir verim elde etmek için bir su banyosu veya bir kolon fırını kullanılabilir (URL-1, 2017).

Moleküler etkileşim türlerine göre kullanılan mobil faz ve sabit faza bağılı olarak normal faz, ters faz, iyon değiştirme, eleme ve kiral ayırma kromatografisi çeşitleri vardır (URL-1, 2017).

Normal faz kromatografide, sabit faz silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış –CN, –NO₂ veya NH₂ gruplarından dolayı polar özellik gösterirken mobil faz polar olmayan ya da düşük polariteye sahiptir ve etileter, kloroform, hekzan vb. çözücüler ve karışımlarından oluşur. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılıma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip analit hareketli fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Alıkonma zamanını kısaltmak için hareketli fazın polaritesi azaltılırken alıkonma zamanını arttırmak için hareketli fazın polaritesi artırılır (URL-1, 2017).

Ters faz kromatografide, sabit faz silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış C18 (oktadesil), oktil, fenil, metil veya etil gruplarından dolayı apolar özellik gösterirken

hareketli faz polar metanol, asetonitril gibi güçlü organik çözücülerin sulu veya tamponlanmış karışımlarıdır. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit hareketli fazda çok iyi çözünür ve sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolondan ilk önce çıkar. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır (URL-1, 2017).

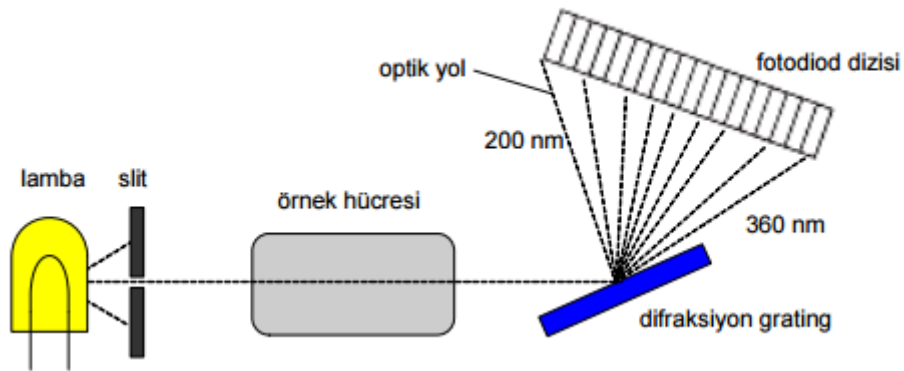
Dedektörler, kolondan elüe olan örnek bileşeninden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan alettir. En çok kullanılan dedektörler UV ışın absorpsiyonuna dayanan dedektörlerdir. Bunlar fotometrik ve spektrofotometrik olabilir. Fotometrelerde bir civa kaynaktan alınan 254 ve 280 nm bandları kullanılır; bu dalga boylarında pek çok organik fonksiyonel grup absorpsiyon yapar. Spektrofotometrik dedektörler fotometrelerden daha elverişlidir, çünkü örnekteki maddelerin absorpsiyon yapacağı dalga boylarını seçme olanağı vardır. Bu dedektörlerde cihazın dalga boyu aralığında, örnekteki maddelerin ışığı absorblaması, fakat çözgenin herhangi bir absorpsiyona neden olmaması gerekir. Sıvı kromatografisi sistemleri için çok çeşitli dedektörler geliştirilmiş olmasına rağmen kullanımı yaygın olan birkaç tip dedektör üzerinde durulmuştur (URL-5, 2017);

1. UV dedektörler
2. Refraktif indeks dedektörler
3. Floresans dedektör
4. Elektrik iletkenlik dedektörü
5. Elektrokimyasal dedektör
6. Transport dedektörler
7. Buharlaştırılmalı ışık saçılması dedektörü
8. Kütle spektrometresi
9. Radyoaktivite dedektörü

Kullanılacak dedektör sistemi, analizi yapılacak numunenin cinsine uygun olmalıdır. Polifenollerin ayrılması ve belirlenmesinde sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektörler diyot dizisi dedektörü (DAD) ve kütle detektörüdür (Bureau vd., 2009).

UV dedektörler, 180-350 nm aralığında ışık absorblayabilen maddeler için uygundur. Hassasiyetleri, yaklaşık olarak 10^{-8} - 10^{-9} M dır. Tüm olefinler, aromatikler, -C=O, -C=S, -N=O ve $-N \equiv N-$ grupları içeren moleküller gibi pek çok bileşik UV bölgede (200-350nm) absorpsiyon yapar. Ultraviyole dedektörler bir örneğin ışığı absorblama yeteneğini ölçer; işlem, örneğin özelliğine göre, bir veya birkaç dalga boyunda ölçüm yapılmasını gerektirebilir. Sabit dalga boylu UV dedektör, değişken dalga boylu UV dedektör, değişken (veya çoklu) dalga boylu dispersiv UV dedektör ve diyet dizi (diod array) dedektör olmak üzere dört tip dedektör vardır (URL-5, 2017).

Şekil 18' de gösterilen diyet dizi dedektöründe geniş aralıklı bir emisyon kaynaktan (deuteryum lamba gibi) gelen ışık bir akromatik mercek sistemiyle paralelleştirilir ve böylece ışığın tamamı, holografik bir grating üzerinde bulunan dedektör hücresinden geçer. Böyle bir düzenlemeyle kaynaktan çıkan tüm dalga boylarındaki ışık örnekten geçmiş olur. Gratingden çıkan dağıtılmış ışık bir diyet dizi üzerine düşer. Bir dizide yüzlerce diyet vardır, her diyetin çıkışı bir bilgisayar tarafından alınır ve bir sabit diskte depolanır. İşlem sonunda her bir diyote karşılık gelen UV dalga boyundaki kromatogram çizilir. Enstrumanların çoğu, ayırma işlemini takiben en az bir diyeti izleyebilecek şekilde tasarlanmıştır; böylece ayırma gerçekleşirken kromatogram da çizilebilmektedir. Bu tür sistemler örnekteki bileşenlerin doğrudan spektrumlarını verdiğinden ideal sistemlerdir (URL-5, 2017).



Şekil 18. Diyet dizisi UV dedektörü

HPLC'ye bağlı kütle spektrometre dedektörleri kolondan çıkan analitlerin iyonlaştırıldığı bir ara fazdan geçerek kütle analizörüne ulaşır ve burada iyonlar m/z

(kütle/yük oranı) değerlerine göre sıralanırlar. İyonların çoğu tek değerlidir. Sistemde, kromatogram alıkonma zamanlarını belirler, kütle analizörü de piklerden, karışımda ne tür moleküllerin bulunduğunu saptar. Kullanımı en yaygın olan kütle analizörü, gaz anyon ve katyonların elektrik ve magnetik alan vasıtasıyla uzun süre tutulmasını sağlayan kuadrupol iyon-kapanı analizördür. Ayrılan iyonlar elektron çoğaltıcı içeren bir iyon dedektörüyle ölçülür (URL-5, 2017).

Fenolik bileşiklerin bazı sınıflarını belirlemek için kullanılan HPLC yöntem parametreleri Tablo 12’de gösterilmiştir (Ignat vd., 2011).



Tablo 3. Farklı fenolik bileşiklerin ayrılması için HPLC parametreleri

Bileşikler	Kolon	Hareketli faz		T (°C)	Akış (mL/dk)	λ (nm)	Kaynak
		A	B				
Fenolik asitler, Flavonoidler	C18 4.6 mm*150 mm, 5 μ m	4% Asetik asit	Metanol	–	1	210–400	Fang vd., (2009) Wang vd., (2009)
Flavon, Antosiyanin	C18 Diamonsil 4.6 mm*150 mm, 5 μ m	0.1% Formik asit suda	80% ACN suda	–	0,5-1	360	Fang vd., (2009)
Fenolik asitler	C18 Phenomenex Gemini 4.6 mm*150 mm, 5 μ m	0.1% Formik asit	100% Metanol	25	0.7	270–325	Ross vd., (2009)
Kateşinler	C18 4.6 mm*250 mm, 5 μ m	15% ACN 2% Asetik asit	80% ACN 2% Asetik asit	35	1	278	Chen vd., (2008)
Polifenoller, Flavonoidler, Fenolik asitler	C18 SunFire 4.6 mm*150 mm, 5 μ m	Metanol	Asetik asit: Su (1:99)	–	1	327–370	Liu vd., (2008)
Fenolik asitler, Flavanoidler	C18 4.6 mm*150 mm, 5 μ m	2% Asetik asit suda	70% ACN suda	30	1,2	280-315	Turumtay vd., (2014)
Fenolik asitler, Kateşinler, Antosiyaninler, Flavonollar	C18 Phenomenex Luna 4.6 mm*250 mm, 5 μ m	Sodyum asetat içinde 6% Asetikasit 2 mM	ACN	–	1	280, 320, 360, 520	Tsao ve Yang (2003)

1.6. Spektrofotometrik Yöntemlerle Fenolik Bileşiklerin Tayini

Genel olarak, fenolik bileşiklerin tayini ayrıştırma, 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).

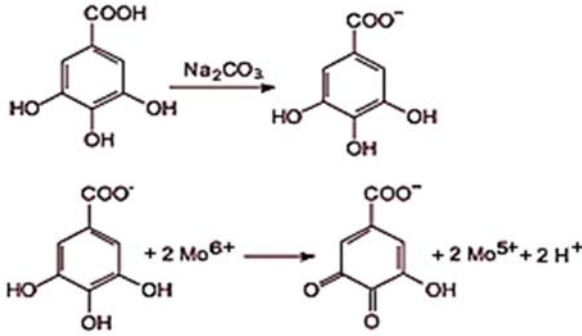
Özellikle fenolik bileşikler arasında büyük kimyasal çeşitlilik nedeniyle, numunelerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için çeşitli testler geliştirilmiştir. Bu testler, reaksiyon mekanizması, hedef türler, reaksiyon koşulları ve sonuçların nasıl ifade edildiği bakımından farklıdır. Antioksidan 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).

1.6.1. Folin Ciocalteau Yöntemiyle Toplam Fenol İçeriğini Belirleme

Polifenolik bileşikler, yüksek antioksidan kapasiteleri nedeniyle, metal iyonlarını kompleksleştirme, radikal reaksiyonları inaktive etme ve hidroperoksitin reaktif oksiradikallere dönüşmesini engelleme özelliğine sahiptir (Dimitros, 2006).

Fenolik bileşiklerin miktar tayinleri çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilir. Bununla birlikte, Folin-Ciocalteau en çok kullanılan reaktiftir. Bu reaktif fosfomolibdik asit ve fosfotungstik asitin karışımından ibarettir, ki alkali ortamda oluşan molibdenyum sarı renkli kompleksinin ($\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oksidasyon basamağı +6' dır. Fenolik bileşikler gibi indirgeme ajanının varlığında bu kompleks oksidasyon basamağı +5 ila +6 arasında olan tungsten-molibdenyum mavi kompleksine indirgenir. Mavi renkli kompleksin UVvis spektrofotometresiyle 760 nm' de ölçülen absorbans şiddeti indirgeme ajanının konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Singleton vd., 1999; Huang vd., 2005; Abdille vd., 2005; Dastmalchi vd., 2007).

Şekil 19’ da fenolat anyonu üretmek suretiyle fenolik bileşiklerin (örnek olarak galik asit) basit bir ortamdaki oluşumunu göstermektedir. Burada, Singleton'a (1999) göre meydana gelen fenolat anyonu ve Folin-Ciocalteu reaktifi arasındaki oksidasyon reaksiyonunda Folin-Ciocalteu reaktifinin bir bileşeni olan molibden indirgenir ve reaksiyon ortamında sarı renk maviye dönüşür (Singleton vd., 1999).



Şekil 19. Gallik asit’ in Folin-Ciocalteu reaktifiyle etkileşimi

Aslında, yaygın olarak fenollerin toplam içeriğini ölçmek için test olarak tanınan Folin-Ciocalteu reaktifi, numunelerin indirgenme kabiliyetini ölçer, ancak bu isimle ifade edilmemiştir. Metodun bir başka zayıf noktası, fenolik içeriğin yüksek tahmin edilmesinin büyük ölçüde gerçekleşmesidir. Aralarında C vitaminin de bulunduğu birçok fenolik olmayan ancak yöntemeye duyarlı olduğu için girişim yapan bileşikler bilinmektedir. Bu girişimlerin etkisinin azaltılması için daha seçici ekstraksiyonlar uygulanmalıdır (Escarpa vd., 2001; Oliveira vd., 2009).

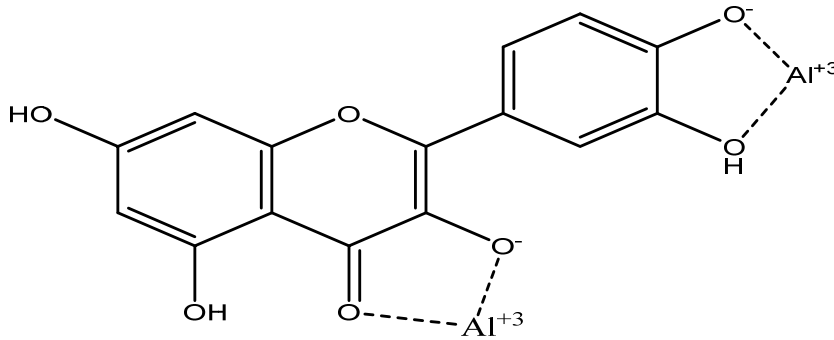
1.6.2. Toplam Flavonoid İçeriğini Belirleme

Bazı kimyasal grupların varlığının teşhisinde alüminyum klorür (AlCl_3) kullanımı ilk olarak antosiyaninler için kullanılmıştır. 1960'lardan itibaren, flavonoidlerin yapısının belirlenmesi için UV-görünür spektrometride bir kayma reaktifi olarak yaygın bir şekilde kullanılan bileşik oldu. Alüminyum katyonu, metanoldeki flavonoidlerle kararlı kompleksler oluşturur ve spektrofotometrik analizle, absorpsiyon şiddetinin daha uzun dalga boylarına doğru kaydırır. Bu yolla, bitkideki flavonoidlerle birarada bulunan diğer fenolik maddelerin, özellikle fenolik asitlerin etkileşiminden kaçınarak, flavonoid miktarını belirlemek mümkündür (Marcucci vd., 1998).

Spektrofotometrede 425 nm' de alüminyum klorür kullanılarak ölçüm yapılır. Bu koşullar altında, flavonoid-Al kompleksi kompleks ilgili flavonoidden çok daha uzun dalga boylarında ışığı absorbe eder. Fenolik asitler, hatta $AlCl_3$ ile kompleks oluşturanlar, çok daha düşük dalga boylarında absorbe ettiklerinden dolayı absorsiyon ölçümlerinde karışımı önlerler (Marcucci vd., 1998).

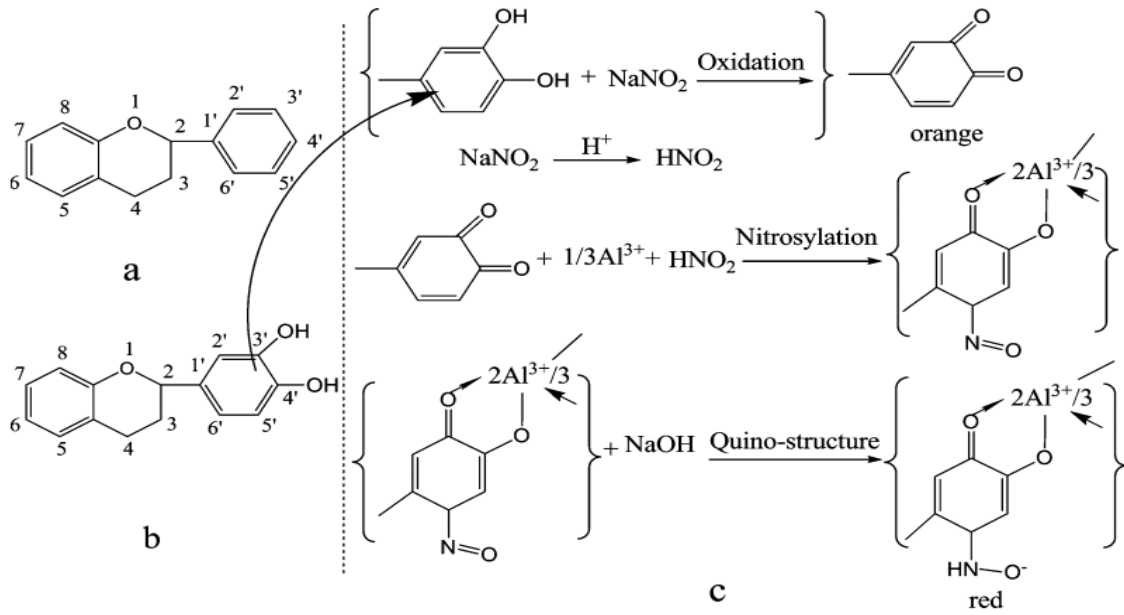
Bir flavonol olan kuersetin, kesinlikle bitkilerde bulunan flavonoidlerin en yaygın olanıdır. Diğer flavonollerin alüminyum ile kompleksleri 425 nm'ye yakın dalga boylarını absorblarken, flavonlardan türetilen kompleksler daha düşük dalga boylarını absorbe eder ve bu da flavon açısından zengin karışımların saptanmasında daha düşük bir değere neden olur (Marcucci vd., 1998).

Alüminyum klorür ($AlCl_3$) kolorimetrik yönteminin ilkesi, $AlCl_3$ 'ün, flavonların ve flavonollerin C-4 keto grupları ve C-3 veya C-5 hidroksil grubu ile kararlı asit kompleksleri oluşturmasıdır. Ayrıca, flavonoidlerin A- veya B- halkasındaki ortodihidroksil grupları ile kararsız asit kompleksleri formundadır (Şekil 20) (Bağ vd., 2015).



Şekil 20. Metanolik $AlCl_3$ çözeltisinde Flavanoid-Al kompleksinin oluşumu

C-4 keto grubuna sahip olmayan kateşinlerde ise bu yöntem modifiye edilerek kullanılır. Alkali ortamında $NaNO_2$ varlığında kompleksleşme reaksiyonu gerçekleştirilir (Şekil 21). Yöntem, bir katekol grubunu taşıyan herhangi bir aromatik halkanın sterik olarak bloke edilmemiş üç veya dört pozisyonlu nitrasyonuna dayanır. Al (III) ilavesinden sonra, sarı renkli bir çözelti, NaOH ilavesinden sonra hemen kırmızıya döner ve absorpsiyon değeri 510 nm'de ölçülür (Pekal 2014).

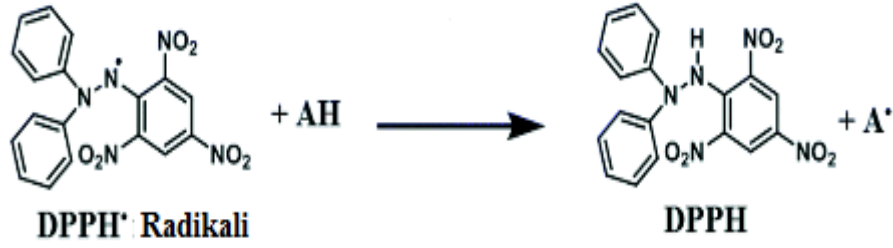


Şekil 21. Katesinlerin NaNO_2 varlığında Al(III) ile kompleksleşme reaksiyonu

1.6.3. DPPH• Serbest Radikal Temizleme ile Antioksidan Aktivite Belirleme

Antioksidan aktivitesini değerlendirmek için en sık kullanılan yöntemlerden biri, 516 nm'lik bir dalga boyunda absorpsiyon veren mor renkli 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikalinin (DPPH•) temizlenme aktivitesini ölçmektir (Huang vd., 2005).

Bir antioksidan ya da radikal ($\text{R}\cdot$) türün etkisiyle, DPPH, sarı renkli 2,2-difenilpikrilhidrazin (DPPH-H) formuna indirgenir ve absorpsiyon bandının kaybolması absorbansın düşünün izlenmesiyle aynıdır (Şekil 22). Elde edilen sonuçlardan, reaksiyon ortamında kalan antioksidan aktivite yüzdesi (antioksidan tarafından tüketilen DPPH miktarı) veya radikal süpürücü ve/veya DPPH yüzdesi belirlenir (Huang vd., 2005).



Şekil 22. DPPH• radikalinin andioksidan bileşiklerle reaksiyonu

1.7. Ekstraktların DNA Polimeraz Enzim Üzerindeki İnhibisyonları

Bakteriler, Gram boyama yönteminden yararlanılarak; Gram negatif ve Gram pozitif olmak üzere gruplandırılırlar. Son görüşlere göre gram boyamadan, hücre duvarının kesinlikle sorumlu olduğu vurgulanmaktadır. Gram pozitif bakterilerin çoğunda hücre duvarı gram negatif bakterilere göre daha kalındır (Midilli, 2016; Budak, 2016).

1.7.1. DNA Polimerazlar

DNA polimerazlar, DNA sentezi için mevcut DNA'yı kalıp olarak kullanır ve kalıba uygun nükleotitlerin ilavesini katalizleyerek DNA'nın duplikasyonunu sağlarlar. İlk tanımlanan polimeraz enzimi, E. coli DNA Polimeraz I'dir ve 1956 yılında Kornberg ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu DNA polimerazlar sadece DNA'nın replikasyonunu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda DNA'nın tamirini ve rekombinasyonunu da gerçekleştirmektedirler. Bütün ökaryotik ve prokaryotik DNA polimerazlar aynı sentez aktivitesini gösterirler. Buna ilaveten bazı DNA polimerazlar ikinci ve üçüncü bir aktivite gösterebilirler. Bu aktivite, 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi (proofreading aktivite) ve 5'→3' nükleaz aktivitesi veya her ikisi birden olabilir (Midilli, 2016).

DNA polimerazlar, DNA sentezinden sorumlu enzimlerdir ve farklı hücrel organizmalar tipik olarak farklı DNA polimeraz tipleri kullanırlar. Replikatif DNA polimerazlar genom replikasyonunun esas kısmının sentezini gerçekleştirirler. Bununla beraber çeşitli özelleşmiş polimerazlar, zarar görmüş DNA'yı tamir ederler veya

Okazaki fragmentlerinden RNA primerlerinin uzaklaştırılmasını sağlarlar (Örn: DNA polimeraz I). DNA polimerazlar A, B, C, D, X ve Y olarak altı familyaya ayrılırlar (Midilli, 2016).

C familyası içerisinde yer alan replikatif DNA polimeraz III enzimleri, hücre içi zorunlu replikasyon enzimleridir ve bütün bakteri sınıflarında bulunurlar (Midilli, 2016).

Bakterilere ait replikatif DNA polimerazlar, primer yapılarına göre iki farklı tipe ayrılırlar. Replikatif DnaE polimerazı gram negative bakterilerde bulunurken, replikatif PolC polimerazı gram pozitif bakterilerde bulunur (Midilli, 2016).

Pol C tipi polimerazlar polC geni tarafından kodlanırken DnaE tipi polimerazlar polE geni tarafından kodlanır. PolC grubu replikatif polimerazlar kendi grupları içerisinde ve DnaE grubu replikatif polimerazlar da kendi grupları içerisinde yüksek oranda benzerlik gösterirken, PolC ve DnaE enzimleri, birbirlerine baz dizilimleri açısından %20'den daha az bir benzerlik gösterirler. Ayrıca bu iki farklı bakteri grubunun replikatif enzimleri, domain organizasyonu yönünden de birbirinden farklıdır. PolC proteini, DnaE proteininde bulunmayan işlevsel bir 3'→5' proofreading (hata düzeltme) domainine sahiptir (Midilli, 2016).

Escherichia coli (*E. coli*) ve *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) DNA polimeraz III, üzerinde en fazla karakterizasyon çalışması yapılan enzimlerdir. Her iki enzim de diğer alt birimlerine ihtiyaç duymaksızın *in vitro*'da sentetik DNA substratları üzerinde polimerizasyon aktivitesi göstermektedir (Midilli, 2016).

1.7.2. C Familyası DNA Polimerazlar (PolIII α)

DNA polimeraz III, bakteriyal genomların replikasyonundan sorumlu replikasyon makineleridir. Esas DNA sentezi DNA polimerazIII α -alt ünite (PolIII α) tarafından gerçekleştirilir ve bu polimerazlar C familyası DNA polimerazlar olarak sınıflandırılırlar (Midilli, 2016).

C familyası DNA polimerazlar sınıflandırıldığında iki büyük forma gruplandırılırlar. Bunlar ortak bir ata polimerazın duplikasyonu ile oluşmuş PolC ve

DnaE formlarıdır. DnaE için tipik örnek, üzerinde en fazla çalışılan Gram (-) *E. coli* polIIIα'dır. PolC ise *B. subtilis* gibi düşük GC baz içeriğine sahip Gram (+) bakteriler için tipik örnektir (Midilli, 2016).

Çay çiçeğinin DNA polimeraz enzim inhibisyonu için gram (+) bakterilerden olan *B. subtilis* (PolC) ve gram (-) bakterilerden olan *E. coli* (DnaE) kullanıldı.

1.8. Literatür Özeti

Xu ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, çay bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ham polisakkaritler sıcak su ile hazırlandı ve saflaştırılmış fraksiyonları selüloz kromatografisiyle fraksiyonlandı. Daha sonra *in vitro* olarak antioksidan ve antitümör aktiviteleri ve *in vivo* olarak hepatoprotektif aktiviteleri araştırıldı. Fraksiyonlar insan gastrik kanseri BGC-823 hücrelerinin büyümesi üzerinde güçlü antioksidan aktivite ve inhibe edici aktivite gösterdi. *In vivo* hepatoprotektif aktivite için, ham polisakkaritlerin serum alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferaz düzeylerini önemli ölçüde önlediğini, malondialdehit oluşumunu azalttığını ve karbon tetraklorür ile indüklenen karaciğer hasarlı farelerde süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz aktivitelerini arttırdığı gösterildi.

Yang ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmada, çay çiçeklerinden elde edilen etanolik ekstraktın ve etilasetat fraksiyonunun, DPPH serbest radikal temizleme testini kullanarak güçlü antioksidan etkinliğe sahip olduğu bulundu. Etilasetat fraksiyonunda bulunan bileşikler güçlü DPPH temizleme aktivitesine sahipti ve çay çiçeklerinin antioksidan aktivitesine kuvvetle katkıda bulundu. Etilasetat fraksiyonundan sekiz kateşin yanı sıra beş flavonol glikozidi izole edildi ve yapıları, kütle spektrometrisi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile, mirisetin-3-O-β-D-galaktopiranosid, kuersetin-3-O-β-D-galaktopiranosid, kamferol-3-O-β-D-galaktopiranosid, kamferol 3-O-β-D-glükopiranozid ve kamferol-3-O-[α-ramnopiranosil-(1-6)-βD glikopiranosid] aydınlatıldı. Ek olarak preparatif sıvı kromatografisi ayırımı ve DPPH testi kombinasyonu kullanılarak çay çiçeklerinin antioksidan aktivitesinden sorumlu ana aktif bileşenlerin epigallokateşin gallat ve epikateşin gallat olduğu bulundu.

Li ve arkadaşlarının 2000' de yürütmüş oldukları mutajenite ve akut ve kronik altı toksite çalışmaları çay çiçeği özütünün güvenliğini değerlendirmek için yapıldı. Yapmış oldukları Ames testinde, metabolik aktivasyon olsun veya olmasın, dört test edilmiş suş'a karşı çay çiçeği ekstraktının (5,0 mg/plaka' a kadar) mutajenik etkisi olmadığı görüldü. Akut toksite çalışmasında, tüm hayvanlar kilo aldı ve aktif ve normal göründüler, bu nedenle LD₅₀ (ölüm dozu) değeri vücut ağırlığının 1 kg başına/ 12,0 g olmalı. Subkronik toksite çalışmasında ise, sağkalım, büyüme, hematoloji, kan kimyası, organ ağırlıkları veya patolojik lezyonlar ile doza bağlı herhangi bir etki gözlenmedi.

Joshi ve arkadaşları (2011) tarafından çay çiçeklerinin açılmamış tomurcuklarından (evre-1) tam çiçeklenmiş (evre-5) evrelerine kadar farklı gelişim evrelerindeki fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri incelendi. Proteinler 1. ve 2. evrede daha yüksek seviyelerdeyken daha sonra çiçekler geliştikçe azaldı. EGC ve EGCG'nin en yüksek içeriği evre 3'te bulundu. En yüksek proantosiyanidin içeriği 2. evrede gözlemlendi ve tam çiçeklenme aşamasında en aza indi. Polifenol oksidaz, β-glukozidaz aktivitelerinin tomurcuklardan 3. aşamaya kadar yükseldiği, bundan sonra da taç yapraklarını bölmeye başladığı ve hafifçe azaldığı tespit edildi. Çiçeğin gelişiminin 3. evresinde, *cis*-linalol oksit (% 3,11), linalool (% 22,73), geraniol (% 2,69), 2,4-di-tert-butilfenol (% 9,71), metil palmitat (% 2,78), metil linoleat (% 2,74), metil salisilat (% 2,62), *p*-terpineol (% 0,33), beta-iyonon (% 1,24) ve nerolidol (% 0,8) gibi glikosidik bağlı uçucu bileşikler daha yüksek miktarda mevcuttu. Ayrıca çay çiçeklerinin antioksidan aktivitesi 3. evrede tomurcuklanarak maksimum seviyeye çıkmış ve tam çiçeklenme aşamasında minimuma inmiştir.

Bakterilerin her geçen gün ortam şartlarına biraz daha uyum sağlamaları, olumsuz şartlara karşı yüksek direnç kazanmalarına neden olmaktadır. Son zamanlarda tüketimi artan antibiyotiklere karşı da geçerli olan bu direnci azaltmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmaların temeli tüketilen antibiyotiklerin insan sağlığına zarar vermeyip sadece bakterilerde etkili olmasıdır. Bunun için de insan üzerinde toksik etkisi olmayan bitkiler ön plana çıkmaktadır. Aynı zamanda antibiyotik direncine sahip olan bakterilerin temizlenmesi için yeni nesil antibiyotik ihtiyacı da bitkisel kaynaklarda araştırılmaktadır.

Bu tez çalışmasında *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze çiçek ekstraktlarının DNA polimeraz enzim inhibisyonları ve bu inhibisyonun hangi fenolik bileşiklerden kaynaklandığı araştırıldı. Bunun için 18 fenolik standart ile geliştirilen HPLC-DAD yöntemi kullanıldı. Kromatografik ayırma öncesi seçilen uygun ekstraksiyon yöntemleriyle çeşitli fraksiyonlar oluşturuldu. Ayrıca elde edilen farklı fraksiyonların fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesi ve antimikrobiyal aktivitesi de belirlendi



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller

Analitik saflık derecesinde olan fenolik bileşik standartların tamamı ve numuneleri hazırlama ve HPLC analizleri için HPLC saflıkta asetonitril (ACN) ve asetik asit (AA), etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), etilasetat, hegzan, folin ciocalteu reaktifi, bütanol, askorbik asit, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), potasyum asetat, Bovine serum albumin (BSA), merkaptotanol, gliserol, nonidet P40, glisin Sigma Aldrich'den, HPLC saflıkta metanol ve sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), alüminyum klorür (AlCl₃), sodyum nitrit (NaNO₂), eter, alüminyum nitrat, β-akrilamid, glukoz, üre, borik asit, potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür (MgCl₂), Tris, etanol Merck'den, dithiothreitol (DTT) Fisher scientific'den, N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED), fenol mavisi BioRad'dan, bisakrilamid Amresco'dan ve dNTP Fermentas'tan satın alındı.

Bu çalışmada, kimyasal madde ve bitki örneklerini tartmak için Precisa analitik terazi, örnekleri parçalamada kullanılan Waring blender, ekstraksiyonu gerçekleştirmek için Heidolph ısıtıcı çalkalayıcı, numunelerin çözünmesine yardımcı olmak için Bandelin Sonorex su banyosu, çöktürme işlemi için Hettich santrifüj, kurutma işlemleri için Nuve FN 400 etüv, çözeltileri karıştırmak için Velp Scientifica vorteks, ultra saf su temini için Sartorius Stedim Biotech Arium 61316 Pro-UV su destile sistemi pH ayarlamada VWR Phenomenal pH metre kullanıldı. Ekstraksiyon sonrası çözücüyü uzaklaştırmak amacıyla Heidolph evaporatör kullanıldı. Toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve antioksidan aktivitesi belirlemede absorbans ölçmek için Thermo Scientific Multiskan Go spektrofotometre kullanıldı.

2.2. Bitkilerin Toplanması

Deneylerde kullanılan çay çiçeği (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), Ağustos 2016'da Rize ili Pazarköy Köyü'nden toplanarak derin dondurucuda muhafaza edildi. Bitkinin çiçek kısmının çanak yaprağı ayrılarak ekstraksiyon verimini artırmak için yüzey alanının genişletilmesi amacıyla öğütme makinesinden geçirilerek parçacık

boyutları küçültüldü. Öğütme işleminin daha kolay gerçekleştirilebilmesi için sıvı azot kullanıldı.

2.3. Çay Çiçeğinin Ekstraksiyonu

Çay çiçeğinin fenolik içeriğini belirleyebilmek için farklı ekstraksiyon yöntemleri paralel olarak uygulandı. Fenolik bileşiklerin bitkilerden ekstraksiyonu için 4 farklı yöntem kullanıldı. Bunlar katı çay çiçeği materyalinden direk olarak metanol ekstraksiyonu (1), bu metanol ekstraktının dietil eter, etil asetat, bütanol ve sulu kısım olarak ayrılacağı sıvı-sıvı ekstraksiyonu (2), metanol ekstraktının asidik hidroliz ürünleri (3) ve bazik hidroliz ürünleri (4) olarak ayrılmıştır. Bu yöntemler ayrıntılı olarak verilecek olursa:

3 farklı yöntem için (sıvı- sıvı ekstraksiyon, asidik hidroliz ve bazik hidroliz) 3 balona 10 g çay çiçeği ve 75 mL metanol eklenerek oda koşullarında 2 saat boyunca karıştırıcıda bekletildi. Katı kısım mavi bant süzgeçten süzülerek ayrıldı. 25 mL metanol ile 3 kez yıkama yapıldı ve tekrar süzgeç kâğıdından süzüldü.

Toplam hacmi 130 mL olarak ölçülen 1. balondaki ekstraktın 5 mL' si, HPLC analizi ve spektrofotometrik analizler için derin dondurucuya kaldırıldı (FM). Geri kalan 125 mL' nin çözücü kuruluğa kadar evaporatörde uzaklatırıldı (1,02 g) ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu için 90 mL ultra saf su ile çözülerek sırasıyla hegzan, eter (FE), etilasetat (FEA) ve bütanol (FB) ile her biri 10 mL 3 tekrarlı olacak şekilde ekstrakte edildi. Hegzan örnekteki yağlı kısımların ayrılması için kullanıldı bu yüzden analizi yapılmadı. Geriye kalan sulu kısım (FW) da dahil olmak üzere bütün fazlar ayrı balonlarda toplanıp çözücüsü evaporatörde uzaklaştırılarak analiz için derin dondurucuda muhafaza edildi (Akyüz vd., 2014).

Asidik hidroliz için 2. balonda elde edilen metanol ekstraktı tamamen kurutulup tartıldıktan sonra (1,03 g) 20 mL metanol ile çözülerek üzerine 20 mL 4N HCl ilave edildi ve 100 °C'lik su banyosunda 2 saat hidrolize tabi tutuldu. Sonrasında sırasıyla eter ve etilasetat ile her biri 6 mL 3 tekrarlı olacak şekilde ekstrakte edildi. Eter ve etilasetat fazları aynı balona toplandı (FAO). Eter ve etilasetat fazı ile geriye kalan sulu

kısmın (FAW) çözücüsü evaporatörde uzaklaştırılarak analiz için derin dondurucuda muhafaza edildi (Justesen vd., 1998; Ma vd., 2009).

Bazik hidroliz için ayrılan 0,91 g metanol ekstraktının üzerine 18 mL 2N NaOH (0,666 g EDTA + 1,8 g askorbik asit) ilave edildi. 4-5 dakika azot gazından geçirildi ve 56 °C'lik su banyosunda 30 dakika ekstrakte edildi. Sonra 6 N HCl ile pH 2,5 olacak şekilde ayarlandı. 6 mL etilasetat ile 3 kez ekstrakte edildi. Etilasetat fazı (FBO) ile geriye kalan sulu kısımların (FBW) evaporatörde çözücüsü uzaklaştırılarak analiz için derin dondurucuda muhafaza edildi (Memon vd., 2013).

2.4. Çay Çiçeği Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri

2.4.1. HPLC-DAD Koşulları

HPLC analizleri dört dalga boyunda aynı anda cevap alınabilen diyot dizisi dedektörü (DAD) ile donanımlı ve otomatik örnekleycili Thermo Ultimate 3000 serisi HPLC-DAD sisteminde yapıldı ve Chromeleon program ile kontrol edildi. Tüm analizler için Agilent C18 PLRP-S analitik kolon (150×4,6mm×5µm) ile kolonla uyumlu Macherey Nagel (iç çap 3mm) ön kolon kullanıldı. HPLC-DAD analizleri için gradient elüsyonu 18 fenolik standardının uygun çözünürlükte ayrılmasını sağlayacak şekilde Akyüz Turumtay ve arkadaşlarının (2016) geliştirdikleri sistemde uygulandı. Bu yöntemde kullanılan çözücüler A: Suda % 2 AA, B: % 50 ACN- % 50 (Suda % 1 AA) ve C: Suda % 70 ACN içermektedir. Gradient sistemi % 95 A mobil fazı ile başlayıp kademeli olarak B mobil fazı yüzdesi ve C mobil fazı yüzdesinin artması ve sonrasında başlangıç düzeyine geri dönecek şekilde ayarlandı. Akış hızı 1,1 mL/dk olup enjeksiyon hacmi 25 µL olarak seçildi. Yöntem için standart olarak gallik asit, protokatekuik asit, kateşin, *p*-hidroksi benzoik asit (*p*-OH benzoik asit), epikateşin, kafeik asit, epigallo kateşin gallat (EGCG), sirinjik asit, rutin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, resveratrol, eriyodiktiyol, luteolin, kuersetin, apigenin ve kaemferol kullanıldı. Analizler için 254-280-315-370 nm deki kromatogramlar 200-400nm aralığında elde edildi. Yüksek polarite ve düşük pH' dan düşük polarite ve

yüksek pH' ya doğru gradient elüsyon çalışıldı. Kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C' ye, otomatik örnekleycinin sıcaklığı 20 °C'ye ayarlandı.

2.4.2. Standartlar, Validasyon ve Kalibrasyon

Kalibrasyon için 18 fenolik standardın çözeltileri çözücüsü 1:1 metanol: suda % 2 asetik asit olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda (0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30; 40 mg.L⁻¹) hazırlandı. Dış standart yöntemine göre gerçekleştirilen kalibrasyonda elde edilen regresyon katsayıları (R²) Tablo 4' te gösterildi.

Validasyon için tekrarlanabilirlik testleri yapıldı. 1 mg.L⁻¹ (gallik asit, kateşin, epikateşin, EGCG, rutin, luteolin ve kuersetin); 0,5 mg.L⁻¹ (protokatekuik asit, sirinjik asit ve eriyodiktiyol); 0,2 mg.L⁻¹ (p-OH benzoik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, resveratrol, apigenin ve kamferol) konsantrasyonda hazırlanan karışımın 7 kez analizi sonucunda elde edilen bağıl standart sapma (%BSS) Tablo 4' te gösterildi.

Kalitatif tespit sınırı (LOD) ile kantitatif belirleme sınırı (LOQ), mg.L⁻¹ cinsinden EPA yöntemine göre hesaplandı. LOD değeri hesaplanırken her bir analit sinyalinin gürültüye oranının (S/N) 3 katı, LOQ değeri için ise S/N oranının 10 katı alınarak belirlendi (Tablo 4).

2.5. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Belirlenmesi

2.5.1. Toplam Polifenol İçeriği (TP)

Metanolik ekstraktların toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemi takip edilerek belirlendi. Spektrofotometrik bir yöntem olan bu tayin, fenolik asitler, flavonoidler ve suda çözünen antosiyaninler de dahil olmak üzere tüm fenolik içerikler üzerine kurulmuştur (Can vd., 2015). Folin reaktifi, maksimum absorbanası 760 nm' de okunabilen mavi renkli bir kompleks verir.

Bu tayinde fenolik asitleri temsilen gallik asit ve flavanoidleri temsilen de epikateşin standart olarak kullanıldı. 20 µL farklı seyreltmelerdeki standart (0,5 - 0,0078 mg/mL) veya metanolik özütlerin üzerine 680 µL saf su ve 400 µL 0,2 N folin reaktifi eklenerek 3 dakika bekletildi. Ardından 400 µL % 10' luk Na₂CO₃ eklenip karanlık ortamda 1 saat bekletilerek spektrofotometrede 760 nm' de ölçüm yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 10' da gösterilmiştir (Singleton vd., 1999).

2.5.2. Toplam Flavonoid İçeriği (TF)

Toplam flavonoid içeriğini belirlemek için iki farklı yöntem kullanıldı. İlk yöntemde (flavonoid içeriği-1) standart olarak kuersetin kullanıldı ve 50 µL farklı seyreltmelerdeki standart (0,5 - 0,00195 mg/mL) veya metanolik özütlerin üzerine 20 µL Al(NO₃)₃, 20 µL CH₃COOK ve 860 µL % 80 metanol eklenerek karıştırıldı. Karanlık ortamda 40 dakika bekletilerek spektrofotometrede 415 nm' de ölçüm yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 10' de gösterilmiştir (Marcucci vd., 1998).

İkinci yöntemde (flavonoid içeriği-2) Rebaya ve arkadaşlarının (2015) kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Bu yöntemde standart olarak kateşin, kuersetin ve epikateşin kullanıldı. 15µL farklı seyreltmelerdeki standart (0,5 - 0,0039 mg/mL) veya metanolik özütlerin üzerine 9 µL % 5 NaNO₂ ilave edilerek 6 dakika bekletildikten sonra üzerine 18 µL %10 AlCl₃ eklendi ve 5 dakika karanlıkta bekletildi. Daha sonra 90 µL 1M NaOH eklenerek son hacim saf su ile 300 µL' ye tamamlandı. Karanlıkta 15 dakika bekletilerek pembe renge dönüşen karışımın absorbansı spektrofotometrede 510 nm' de ölçüldü. Elde edilen veriler Tablo 10' de gösterilmiştir.

Toplam flavanoid içeriği-1'de yapılan alüminyum klorür (AlCl₃) kolorimetrik tayininde toplam flavanoid içeriğinin sadece flavonları ve flavonolleri yansıtmama sebebi Al⁺³ ile flavon ve flavonolların C-4 keto grubu ve C-3 ya da C-5 hidroksil gruplarından biriyle kararlı kompleksler oluşturmasıdır. Fakat Flavan-3-ollerde C-4 keto grubunun olmaması Al⁺³ ile kompleks oluşturamamasına neden olmaktadır. Bu nedenle çay çiçeğinin HPLC analizlerinde tespit edilen kateşinlerin kolorimetrik testle de tayin edilebilmesi için diğer bir yöntem olan toplam flavonoid içeriği-2 yöntemi kullanıldı.

Flavonoid içeriği-2 yönteminde kullanılan NaNO₂ flavan-3-ollerin Al³⁺ ile kompleks vermelerini sağlamaktadır (Rebaya vd., 2015).

2.6. Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı seyreltmelerdeki metanolik ekstraktların ve standartların (gallik asit, kateşin, epikateşin ve kuersetin) radikal temizleme aktivitesini belirlemek için kararlı DPPH• (2,2-Difenilpikrilhidrazil) radikali kullanıldı. Bu kolorimetrik test, hazırlanan 100 µM DPPH• çözeltisi kullanılarak denendi. DPPH• radikali, antioksidan ajanların varlığında mor renge sahiptir, bu nedenle absorbans değişikliği 517 nm' de ölçüldü. Elde edilen veriler Tablo 10' da gösterilmiştir (Molyneux, P., 2004).

2.7. Ekstraktların DNA Polimerazlar Üzerindeki İnhibisyonları

Çay çiçeği ekstraktlarının iki DNA polimeraz enzimi (DnaE ve PolC) üzerindeki inhibisyonlarının incelenmesi için enzim saflaştırma ve inhibisyon testleri yapıldı.

2.7.1. DnaE ve PolC' nin Saflaştırılması

E. coli'den izole edilen DnaE' nin ve *B. subtilis*'den izole edilen polC' nin ekspresyonu, Sandallı ve diğerleri tarafından 2010' da yapılan çalışmasında ayrıntılı olarak açıklanan *E. coli* One Shot® BL21 Star™ (DE3) hücrelerinde gerçekleştirildi. N-Terminalli hekza-histidin-etiketi içeren her iki rekombinant polimeraz, üretici tarafından (Promega) önerilen bir protokol kullanılarak nikel afinite kolonu ile saflaştırıldı. Enzimin saflaştırılması, her aşamada sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE, % 8 jel) ile izlendi. Protein konsantrasyonları NanoDrop (ND-1000 Spektrofotometre) yöntemi ile belirlendi.

2.7.2. Primer Uzatma Deneyi

Bitki ekstraktının varlığında ve yokluğunda DNA polimeraz aktivitesi, primer uzatma deneyi ile araştırıldı (Sandallı, vd., 2010; Sandallı, vd., 2009). İki farklı reaksiyon karışımı hazırlandı. 10 µL' lik reaksiyon karışım içeriği;

- Birinci karışım: 1X polimeraz aktivite tamponu (50 mM HEPES, pH 7.5), 100 ng 45/20-mer DNA (Cy5 ile etiketlenmiş 5 'uç), 10 mM MgCl₂ ve her bir 250 µM dNTP.
- İkincisi buz üzerinde 1 µL bitki özütü yada fraksiyonları ve her replikatif polimerazdan (DnaE ve polC) 25 nM ile hazırlandı. İkinci reaksiyon karışımı buz üzerinde 10 dakika tutuldu ve sonra reaksiyonlar DnaE ve polC için 10' uncu dakikada 30 ° C' de karışım l' in eklenmesiyle başlatıldı.

45/20-mer sentetik DNA kalıbı

3' - GCAATCGGTGAGGCTCACACTCGACTGAAGTACGACAGCCACTAG - 5'
5' - CGTTAGCCACTCCGAGTGTG - 3'

Şekil 23. 5'-ucundan Cy5 ile florojenik işaretli çift zincir sentetik DNA kalıbı

Tepkimeler, 2X durma solüsyonu (20 mM EDTA, % 0,2 (a/h) SDS, % 80 (h/h) formamid ve bromofenol mavisi ve ksilen siyanonun her birinden % 0,008 (a/h)) ilave edilerek durduruldu ve 95 °C' de 5 dakika boyunca ısıtıldı. 6 µL' lik numune % 16' lık bir poliakrilamid-8M üre jeline yüklendi ve ürünler 1,500 V' da 3 saat ayrıldı. Ortaya çıkan jel, Typhoon FLA9500 (Amersham Biosciences) ile görselleştirildi.

2.8. Antimikrobiyal Aktivite Deneyinin Yapılışı

Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürlerinden Mueller-Hinton sıvı besiyeri içinde (MH) (Difco, Detroit, MI), yaklaşık olarak Mac Farland 0,5 bulanıklıkta olacak şekilde (10^{6-7} koloni oluşturan birim (kob/mL)) sulandırılmaları hazırlandı. Önceden hazırlanmış Mueller Hinton Agar besiyeri üzerine steril pamuklu çubuk yardımıyla yayma ekimleri yapıldı (Budak, 2016).

Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her bir kuyucuğa bitki stok özütlerinden 50 µL damlatıldı. Bakteri ihtiva eden petriler 24 saat 36 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla inhibisyon zon çapları ölçüldü. Standart kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg) ve standart çözücü kontrolü olarak DMSO kullanıldı (Budak, 2016).

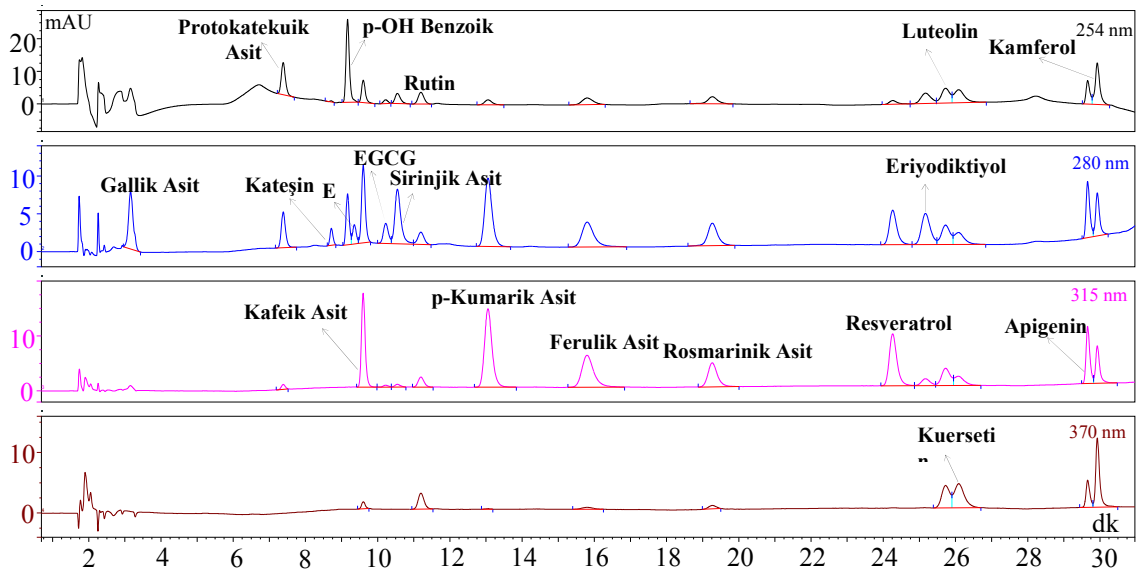


3. BULGULAR

3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-DAD Metot Optimizasyonu

HPLC-DAD Yöntemi ile 18 fenolik standardın ayırımı 50 dakika içinde gerçekleşti. Ayırma yöntemi, hassasiyet ve geçerlilik bakımından değerlendirildi. Bu amaçla, alıkonma zamanlarının (RT) ve pik alanların tekrar edilebilirliği (LOD) için hazırlanan düşük konsantrasyondaki standart karışımın 7 kez analizi ile hesaplandı ve %95 güven seviyesinde kabul edilebilir aralıkta bulundu (%BSS < %5). Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) değerleri her bir fenolik standart için belirlendi ve sonuçlar Tablo 13' te verildi. Kuersetin ve gallik asit dışında diğer fenolik standartlar için oldukça düşük tayin (LOD<0,038 mg/L) ve ölçüm limitleri (LOQ<0,125 mg/L) elde edildi. Doğrusal kalibrasyon grafiklerinde $R^2 > 0,99$ olarak hesaplandı. HPLC-DAD yöntemine göre 18 fenolik standarda ait kalibrasyon ve validasyon parametreleri Tablo 13' te gösterildi.

Optimize edilen HPLC-DAD yöntemi kullanılarak 18 fenolik standardın 254, 280, 315 ve 370 nm' deki kromatogramı Şekil 15'te gösterildi. Fenolik standartların alıkonma zamanları (RT) ve isimleri Tablo 13' te verildi.



Şekil 24. Fenolik standartların (1 mg.L⁻¹) HPLC-DAD kromatogramı

Tablo 13’te görüldüğü gibi standartların alıkonma zamanlarının (RT) yüzde bağıl standart sapması (%BSS) gallik asit için 1,89 olarak en yüksek bulunurken diğer standartların %BSS (RT) değerleri oldukça düşük (<0,36) yani tekrarlanabilirlikleri daha yüksek bulundu. Pik alanlarının %BSS değerleri en yüksek kuersetin ve gallik asit için sırasıyla 3,321 ve 2,642 bulundu ve diğer bileşenlerde daha küçük bağıl sapmalar elde edildi.

Tablo 4. Fenolik standartların kalibrasyon ve validasyon parametreleri.

Bileşikler	RT_{ort} (dk)	R²	%BSS (RT)	%BSS (Alan)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Gallik Asit	3,25	1,000	1,885	2,642	0,062	0,208
Protokatekuik Asit	7,49	0,999	0,361	0,591	0,010	0,033
Kateşin	8,79	1,000	0,147	1,471	0,029	0,098
<i>p</i>-OH Benzoik Asit	9,22	1,000	0,182	0,353	0,002	0,006
Epikateşin	9,44	0,999	0,158	1,548	0,031	0,102
Kafeik Asit	9,68	1,000	0,182	0,337	0,003	0,011
EGCG	10,37	0,999	0,250	1,731	0,038	0,125
Sirinjik Asit	10,62	1,000	0,199	1,293	0,020	0,068
Rutin	11,35	0,999	0,341	0,776	0,029	0,096
<i>p</i>-Kumarik Asit	13,21	1,000	0,331	0,429	0,003	0,009
Ferulik Asit	16,01	0,999	0,351	1,675	0,011	0,038
Rosmarinik Asit	19,53	0,999	0,267	1,218	0,009	0,028
Resveratrol	24,46	1,000	0,167	0,484	0,003	0,011
Eriyodiktiyol	25,36	1,000	0,161	0,684	0,014	0,048
Luteolin	25,92	0,997	0,151	0,453	0,020	0,067
Kuersetin	26,29	1,000	0,156	3,321	0,133	0,443
Apigenin	29,70	1,000	0,041	0,711	0,004	0,012
Kamferol	29,97	1,000	0,040	1,338	0,030	0,099

3.2. Çay Çiçeği Ekstraktlarındaki Fenolik Bileşiklerin HPLC-DAD Analizleri

Çay çiçeğinin metanol (FM), eter (FE), etilasetat (FEa), bütanol (FB) ve sulu (FW) ekstraktlarının fenolik içeriği kalibrasyon ve validasyonu yapılan HPLC-DAD yöntemi ile analiz edildi ve sonuçlar Tablo 5’ te verildi. Kromatogramlarda düşük alana sahip olanlar ise Tablo 6’ te gösterildi.

Çay çiçeği ekstrakt ve fraksiyonlarının kromatogramlarında bazı piklerin UV spektrumları standartlar ile aynı sahip iken alıkonma zamanları farklı olduğu bu pikler ilgili standardın türevi (T.) olarak adlandırıldı ve miktarları ilgili standartın eşdeğeri

olarak hesaplandı. Örneğin; kateşin ile aynı spektruma sahip farklı alıkonma zamanına sahip pikler Kateşin T. olarak adlandırılıp miktarları, kateşin eşdeğeri olarak hesaplandı.

Tablo 5. Katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraktlarının HPLC-DAD analiz sonuçları

RT (dk)	Bileşik Adı	^a FE	^a FEa	^a FB	^a FW	^a FM
3,31	Gallik Asit	0,33	0,57	0,42	0,62	0,55
8,38	Protokatekuik Asit T.	0,02	-	-	-	-
8,82	Kateşin	-	0,42	-	-	-
9,30	Epikateşin	12,31	24,30	56,93	9,43	19,25
10,01	EGCG	0,31	0,81	2,90	-	-
10,23	Rutin T.	-	-	-	0,24	-
10,41	Rutin T.	-	-	-	0,27	-
10,44	Sirinjik Asit	1,29	4,55	-	-	-
11,17	Luteolin T.	0,60	1,17	4,61	-	0,97
11,99	Luteolin T.	-	-	6,58	-	1,30
12,18	Luteolin T.	0,83	1,03	-	-	-
12,58	Rutin T.	-	-	1,96	-	0,23
12,68	Luteolin T.	-	-	-	-	-
13,85	Luteolin T.	-	-	1,15	-	0,10
14,46	Kateşin T.	23,91	52,72	-	-	15,07
14,86	Luteolin T.	-	-	0,63	-	0,16
16,44	Luteolin T.	0,19	0,64	-	-	-
20,50	Kateşin T.	1,39	2,06	-	-	-
20,91	Kateşin T.	0,70	1,68	0,89	-	0,15
27,79	Kateşin T.	3,51	-	-	-	-
29,14	<i>p</i> -Kumarik Asit T.	0,01	0,09	-	-	-
	Fenolik Asit	3,90	7,94	4,88	0,73	1,45
	Toplam Kateşin	42,13	81,99	60,72	9,43	34,47
	Toplam Diğer Flavonoidler	1,62	2,84	19,61	1,11	5,04

a: mg/g ekstrakt, - : Görülmedi

Tablo 6. HPLC-DAD analizinde düşük alana sahip olan bileşiklerin miktarları

RT (dk)	Bileşik Adı	^a FE	^a FEA	^a FB	^a FW	^a FM
9,67	Kafeik Asit	-	0,01	-	-	-
11,23	Luteolin T.	-	-	-	0,40	-
12,10	Luteolin T.	-	-	-	0,61	-
12,67	Rutin T.	-	1,13	-	-	0,41
13,29	<i>p</i> -Kumarik Asit	0,04	-	-	-	-
13,30	Kateşin T.	-	-	-	-	0,42
14,13	Luteolin T.	0,09	-	-	-	-
18,19	Kateşin T.	-	-	-	-	0,16
19,61	Kateşin T.	-	-	0,62	-	0,21
19,90	Kateşin T.	0,13	-	-	-	-
20,33	Kateşin T.	-	-	0,40	-	0,36
21,28	Kateşin T.	-	-	-	-	0,17
21,44	Kateşin T.	-	0,74	-	-	-
22,07	Kateşin T.	-	0,46	-	-	-
22,37	Kateşin T.	-	0,27	-	-	-
25,61	Kateşin T.	-	-	-	-	0,74
26,44	Kateşin T.	-	-	-	-	0,37
26,94	Kateşin T.	-	-	-	-	2,52
28,58	Kateşin T.	-	-	-	-	0,35
31,48	Kateşin T.	0,65	-	1,87	-	-
31,63	Kateşin T.	0,87	-	2,49	-	-

a: mg/g ekstrakt, - : Görülmedi

HPLC-DAD kromatogramlarında yapısı tanımlanamayan pikler UV spektrumlarının benzerliğine göre bilinmeyen A, B, C, D, E, F, G ve H olarak adlandırıldı. Aynı spektruma sahip olup farklı alıkonma zamanlarına sahip bilinmeyen piklerde ise ilgili harf kodu numaralandırıldı. Örneğin; ilk elue edilen bilinmeyen D piki, D₁ olarak adlandırıldı. Bilinmeyen bu piklerin bilinenler cinsinden hesaplanabilmesi için, UV spektrumlarına göre fenolik asitleri temsilen gallik asit (bilinmeyen D, F, G ve H) ve flavonoidleri temsilen kuersetin (bilinmeyen A, B, C ve E) tipi olarak iki gruba ayrıldı. Bilinmeyen bileşenlerin miktarları, gallik asit ya da kuersetin eşdeğeri cinsinden hesaplandı (Tablo 7).

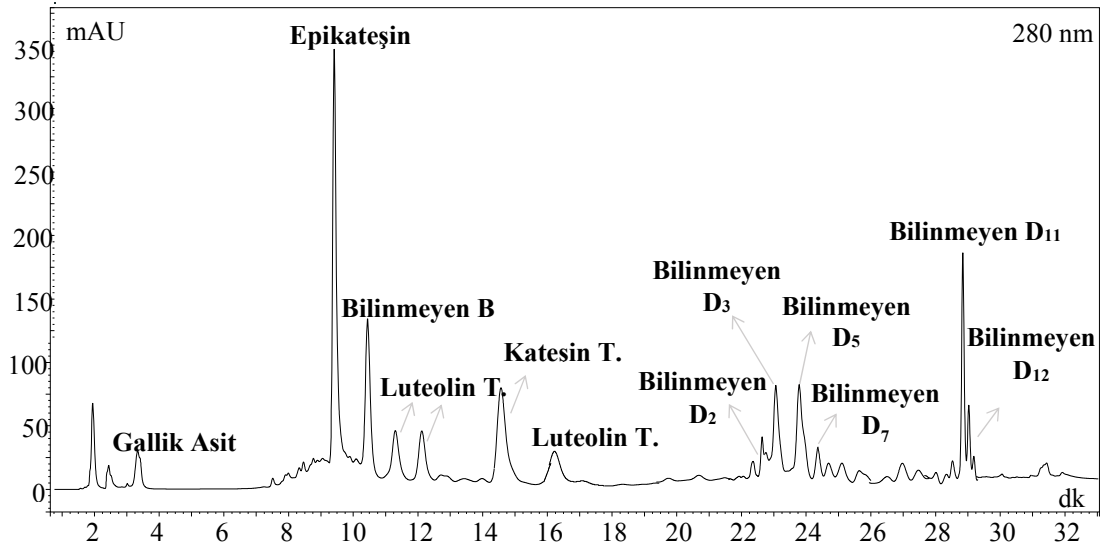
Tablo 7. Bilinmeyen piklerin gallik asit ya da kuersetin eşdeğeri cinsinden miktarları

RT (dk)	Bileşik Adı	^a FE	^a FEa	^a FB	^a FW	^a FM
10,31	Bilinmeyen B	-	-	3,63	-	2,07
22,06	Bilinmeyen D ₁	-	-	0,17	-	-
22,47	Bilinmeyen D ₂	-	-	0,18	-	0,02
22,92	Bilinmeyen D ₃	-	-	0,84	-	0,18
22,98	Bilinmeyen D ₄	-	-	-	0,03	-
23,69	Bilinmeyen D ₅	-	-	2,86	-	0,19
23,79	Bilinmeyen D ₆	0,48	0,47	-	0,08	-
24,30	Bilinmeyen D ₇	-	-	-	-	0,07
24,42	Bilinmeyen D ₈	0,08	0,09	-	-	-
24,74	Bilinmeyen D ₉	0,08	0,25	0,20	-	0,04
25,20	Bilinmeyen D ₁₀	0,07	0,19	-	-	0,05
25,77	Bilinmeyen G ₁	0,17	0,12	-	-	-
26,62	Bilinmeyen G ₂	0,11	0,05	-	-	-
26,93	Bilinmeyen G ₃	-	-	0,20	-	-
27,12	Bilinmeyen G ₄	0,71	0,39	-	-	-
28,64	Bilinmeyen G ₅	0,15	0,03	-	-	-
28,96	Bilinmeyen H ₁	0,40	1,15	-	-	0,27
29,12	Bilinmeyen D ₁₁	-	-	-	-	0,06
29,28	Bilinmeyen D ₁₂	-	-	-	-	0,00
30,33	Bilinmeyen D ₁₃	-	-	-	-	0,03

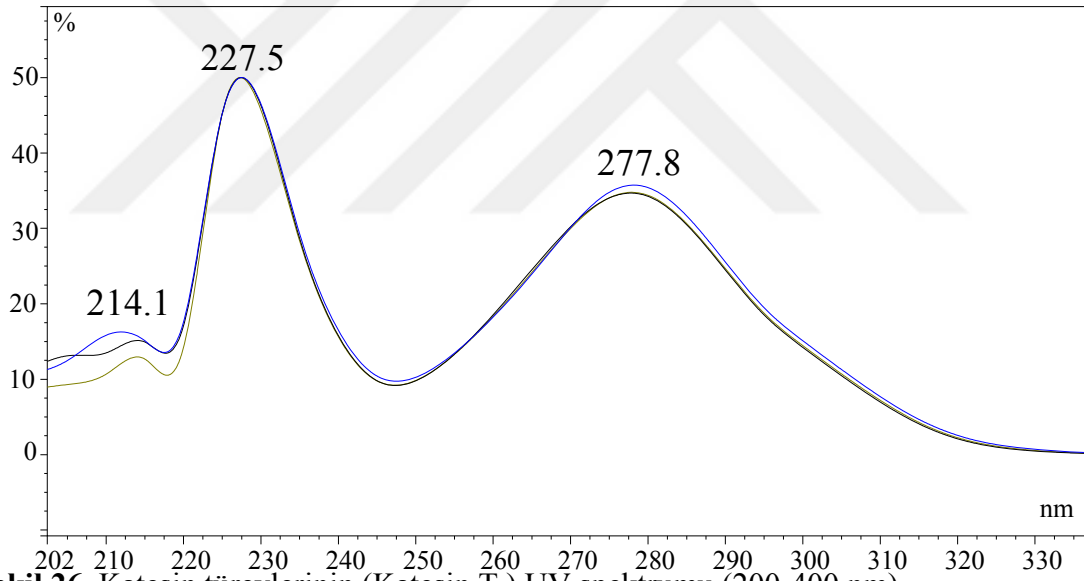
a: eşdeğer mg gallik asit/g ekstrakt (bilinmeyen D, F, G ve H için)

a: eşdeğer mg kuersetin/ g ekstrakt (bilinmeyen A, B, C ve E için), - : Görülmedi

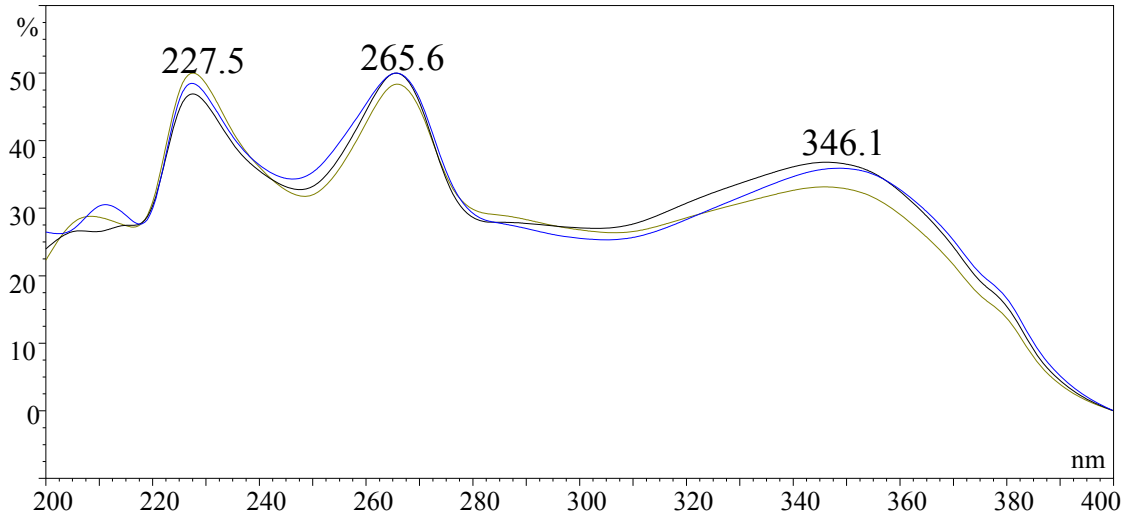
HPLC-DAD sisteminde yürütülen metanol ekstraktının, gallik asit ve epikateşin'in yanında kateşin ve luteolin türevi bakımından da zengin içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca rutin ve yapısı bilinmeyen (D: 315-267 nm) piklerde mevcuttur. Metanol ekstraktında epikateşin, 19,25 mg/g ekstrakt miktarı ile ilk sırada olup onu bir kateşin türevi (15,07 mg/g ekstrakt) takip etmektedir. Metanol ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı Şekil 25' te verilmiştir. Kateşin ve luteolin türevlerinin UV spektrumları da sırasıyla Şekil 26 ve Şekil 27' de verilmiştir.



Şekil 25. Metanol ekstraktının (FM) 280 nm’deki kromatogramı

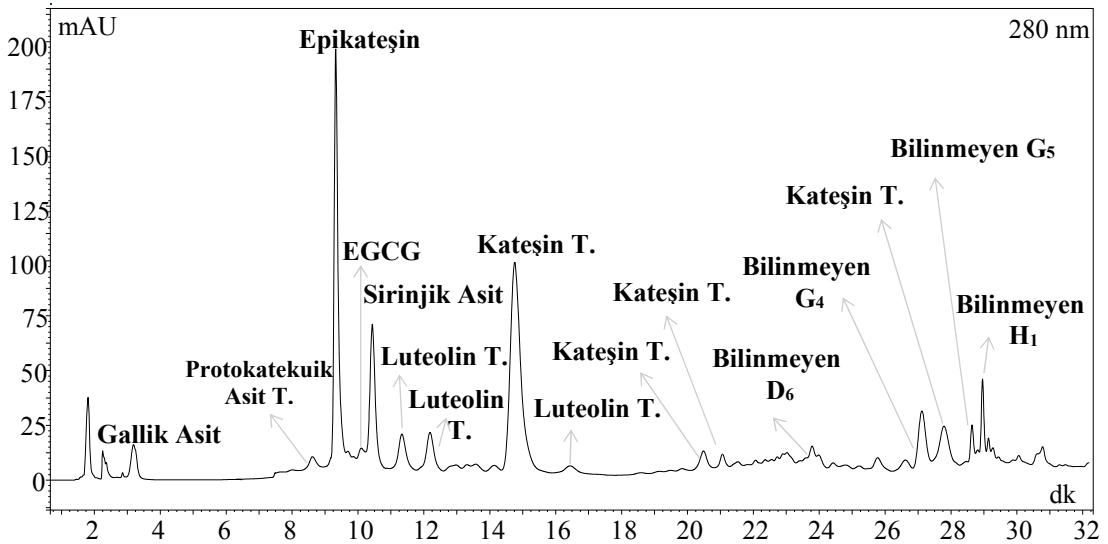


Şekil 26. Katesin türevlerinin (Katesin T.) UV spektrumu (200-400 nm)



Şekil 27. Luteolin türevlerinin (Luteolin T.) UV spektrumu (200-400 nm)

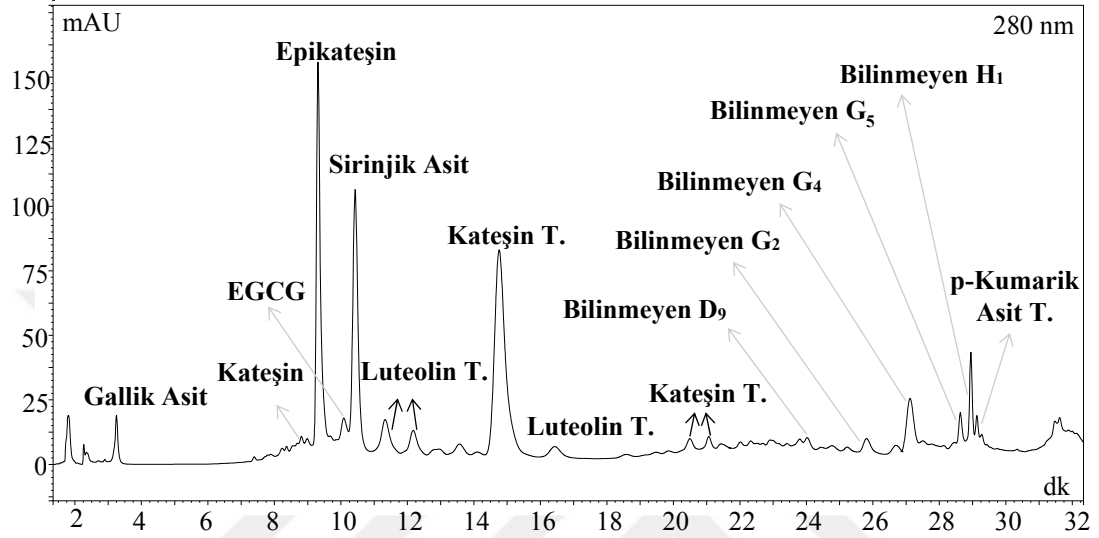
Eter fraksiyonunun içeriğinde gallik asit, epikateşin, EGCG, sirinjik asit, *p*-kumarik asit ve kamferol yanında ağırlıklı olarak kateşin ve luteolin türevleriyle yapısı bilinmeyen D (315 ve 267 nm), G (274 ve 375 nm) ve H (298 ve 225 nm) bileşenleri mevcuttur. Bu fraksiyonun 280 nm'deki kromatogramı Şekil 28' de gösterilmiştir.



Şekil 28. Eter fraksiyonunun (FE) 280 nm'deki kromatogramı

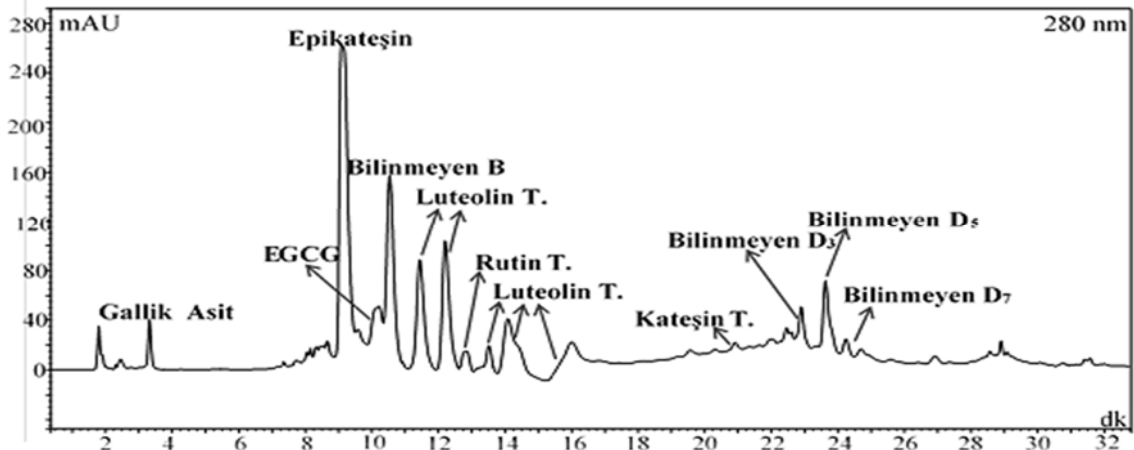
Etilasetat fraksiyonu, gallik asit, kateşin, epikateşin, kafeik asit, EGCG ve sirinjik asit ile birlikte ağırlıklı olarak kateşin ve luteolin türevleri içermektedir. Ayrıca bu

fraksiyonda yapısı bilinmeyen D (315 ve 267 nm), bilinmeyen G (274 ve 375 nm) ve bilinmeyen H (298 ve 225 nm) bileşenleri de mevcuttur. Etilasetat fraksiyonunun fenolik bileşenleri eter fraksiyonu ile benzerlik göstermektedir. Etilasetat fraksiyonunun 280 nm'deki kromatogramı Şekil 29' da gösterilmiştir.



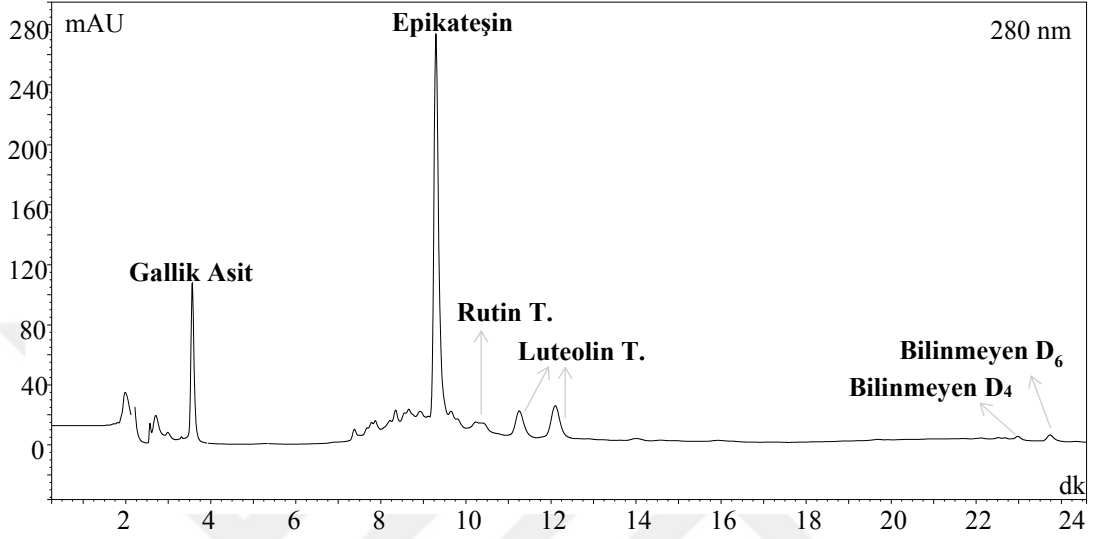
Şekil 29. Etilasetat fraksiyonunun (FEa) 280 nm'deki kromatogramı

Bütanol fraksiyonu, gallik asit, epikateşin ve EGCG fenolik bileşiklerinin yanında kateşin ve luteolin türevleri de içermektedir. Ayrıca yapısı bilinmeyen B (272, 360 ve 228 nm), bilinmeyen D (315 ve 267 nm) ve bilinmeyen G (274 ve 375 nm) bileşenleri de mevcuttur. Bütanol fraksiyonunun 280 nm'deki kromatogramı Şekil 30' da verilmiştir.



Şekil 30. Bütanol fraksiyonunun (FB) 280 nm'deki kromatogramı

Sıvı sıvı ekstraksiyonun son fraksiyonu olan sulu fraksiyonun fenolik içerik bakımından zayıf kaldığı Tablo 6 ve Şekil 31’ de görülmektedir. Öte yandan içeriğinde gallik asit, epikateşin belirgin miktarda bulunmaktadır. Ekstraktaki epikateşin miktarı,



9,43 mg std/g ekstrakt olarak en fazladır.

Şekil 31. Sulu fraksiyonun (FW) 280 nm’deki kromatogramı

Çay çiçeğinin asidik hidroliz ekstraksiyonu, asidik hidroliz organik (FAO), asidik hidroliz sulu (FAW), bazik hidroliz organik (FBO), bazik hidroliz sulu (FBW) fraksiyonlarının HPLC-DAD analiz ile fenolik içeriğinin ve miktarlarının sonuçları Tablo 8’ de ve yapısı bilinmeyen bileşiklerin gallik asit ve kuersetin eşdeğer gramı cinsinden miktarları ise Tablo 9’ da gösterildi.

Tablo 8. Asidik ve bazik hidroliz fraksiyonlarının HPLC-DAD analizi sonuçları

RT (dk)	Bileşik Adı	^a FAO	^a FAW	^a FBO	^a FBW
3,31	Gallik Asit	7,53	0,11	19,68	0,11
7,17	Kateşin T.	25,89	-	-	-
7,40	Kateşin T.	-	0,49	-	-
7,48	Protokatekuik Asit	1,03	-	0,25	-
7,89	Kateşin T.	10,37	-	-	-
8,20	Kateşin T.	-	-	6,64	-
8,36	Kateşin T.	-	-	2,34	-
8,50	Kateşin T.	-	-	1,86	-
8,67	Kateşin T.	-	0,20	-	-
8,98	Kateşin T.	24,14	-	-	-
9,30	Epikateşin	-	12,81	6,83	-
9,67	Kafeik Asit	-	-	0,33	-
9,79	Luteolin T.	-	-	-	0,01
10,23	Rutin T.	-	-	-	0,03
10,41	Rutin T.	-	-	0,23	0,05
11,23	Luteolin T.	-	-	0,06	0,08
11,80	Kuersetin T.	2,49	-	-	-
11,81	Rutin T.	-	0,09	-	-
12,10	Luteolin T.	-	-	-	0,14
12,35	Kateşin T.	2,54	-	-	-
12,68	Luteolin T.	-	-	-	0,03
13,29	<i>p</i> -Kumarik Asit	-	-	1,24	-
13,85	Luteolin T.	-	-	-	0,01
13,92	Kamferol T.	-	-	0,01	-
14,76	Kateşin T.	18,43	-	-	-
14,93	Kamferol T.	-	-	0,21	-
16,10	Luteolin T.	-	-	0,48	-
19,90	Kateşin T.	-	-	-	0,03
21,25	Eriyodiktiyol T.	-	-	0,30	-
23,73	Eriyodiktiyol T.	-	-	0,19	-
25,15	Resveratrol	-	-	0,04	-
31,63	Kateşin T.	12,98	-	-	-
	Fenolik Asit	10,32	0,11	29,87	0,11
	Toplam Kateşin	94,35	13,50	10,84	0,03
	Toplam Diğer Flavonoidler	3,83	0,92	3,18	0,35

a: mg std/g ekstrakt, - : Görülmedi

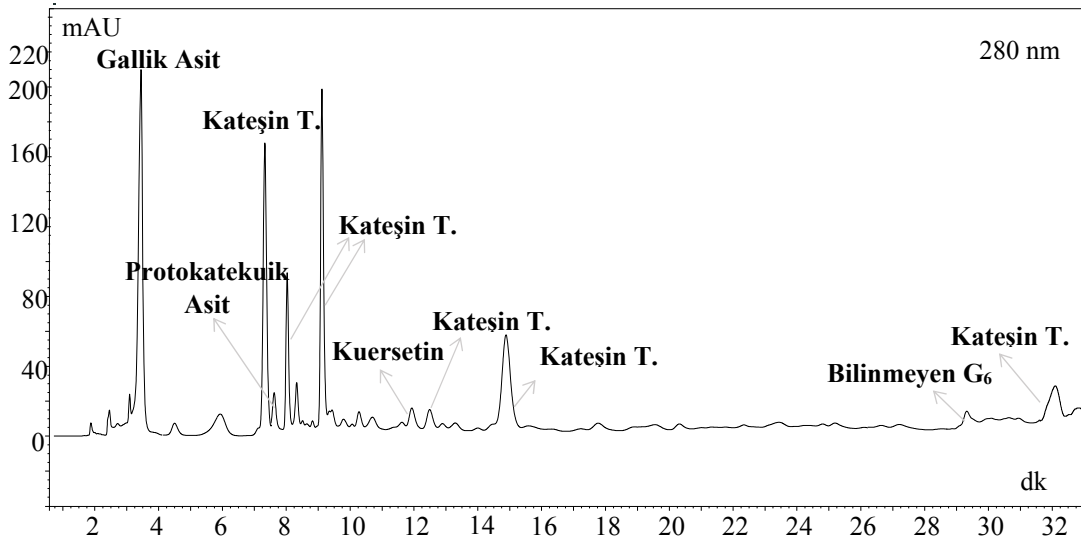
Tablo 9. Bilinmeyenlerin eşdeğer gram cinsinden miktarı

RT (dk)	BİLEŞİK ADI	a,bFAO	a,bFAW	a,bFBO	a,bFBW
9,66	Bilinmeyen A ₁	-	0,03	-	-
11,26	Bilinmeyen A ₂	-	0,01	-	-
14,93	Bilinmeyen C	-	-	0,30	-
22,20	Bilinmeyen E	0,27	-	-	-
23,11	Bilinmeyen F	-	-	0,09	-
28,96	Bilinmeyen H ₁	-	-	1,07	-
29,11	Bilinmeyen H ₂	-	-	0,35	-
29,27	Bilinmeyen H ₃	-	-	0,07	-
29,85	Bilinmeyen G ₆	0,37	-	-	-

a: eşdeğer mg gallik asit/g ekstrakt (bilinmeyen D, F, G ve H için)

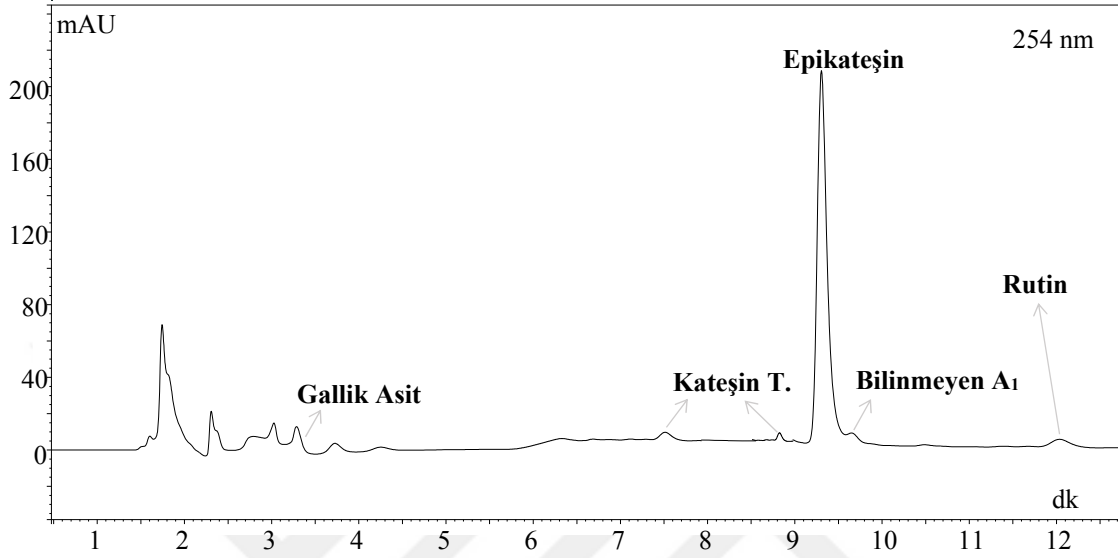
b: eşdeğer mg kuersetin/ g ekstrakt (bilinmeyen A, B, C ve E için), - : Görülmedi

Kromatogramı Şekil 32' de gösterilen ve kateşin türevlerince zengin olan asidik hidroliz organik fraksiyonunda gallik asit ve protokatekuik asit tespit edildi. Miktar içeriği olarak kateşin türevleri ve gallik asitten düşük olan protokatekuik asit (1,03 mg/g ekstrakt) ilk kez asidik hidrolizin organik ekstraktında görüldü. Ayrıca bu ekstrakt içeriğinde kuersetin (2,49 mg/g ekstrakt) de tespit edildi.



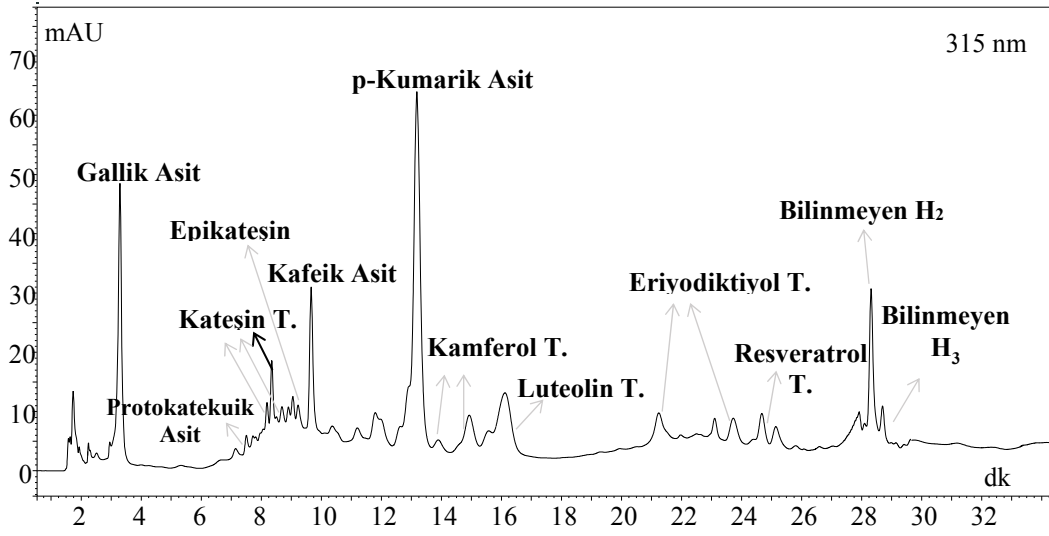
Şekil 32. Asidik hidroliz organik fraksiyonunun (FAO) 280 nm'deki kromatogramı

Asidik hidrolizin sulu fraksiyonunun fenolik içeriği sıvı sıvı ekstraksiyonun sulu fraksiyonunda görüldüğü gibi zayıftır (Şekil 33). Gallik asit ve epikateşinin yanında kateşin, rutin ve yapısı bilinmeyen bileşik türevleri de bulunmaktadır.



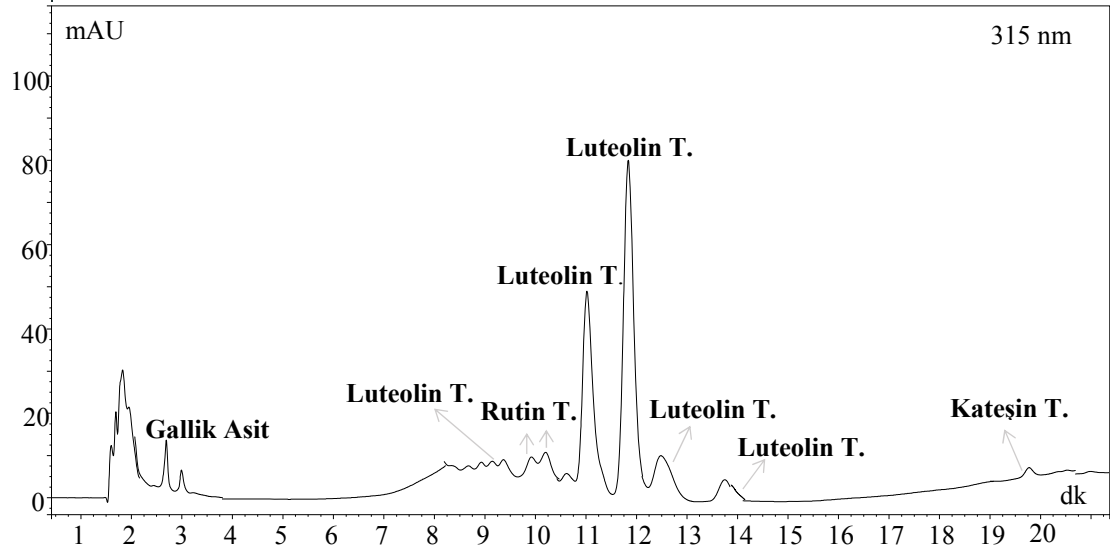
Şekil 33. Asidik hidroliz sulu fraksiyonunun (FAW) 254 nm’ deki kromatogramı

Yapısı bilinmeyen bileşenlerin yanında bazik hidroliz organik fraksiyonunun içeriği diğer fraksiyonlardan farklıdır. Bazik hidroliz organik fraksiyonunda gallik asit, protokatekuik asit, epikateşin, kafeik asit, *p*-kumarik asit ile kateşin, luteolin, rutin, kamferol, eriyodiktiyol ve resveratrol türevleri görüldü. Şekil 34’ deki kromatogramda ve Tablo 10’ da görüldüğü gibi içeriğindeki farklı türdeki fenolik bileşenin fazla olması bazik hidroliz organik fraksiyonunu diğer ekstraktlardan ayırmıştır.



Şekil 34. Bazik hidroliz organik fraksiyonunun (FBO) 315 nm’ deki kromatogramı

Bazik hidroliz sulu fraksiyonu ise gallik asit yanında kateşin, luteolin ve rutin türevlerini içermektedir. Miktar içeriği bakımından gallik asit, 0,11 mg std/g ekstrakt olarak en fazla bulunurken diğer bileşenler daha az miktarda tespit edilmiştir. Bazik hidroliz sulu fraksiyonunun analizine ait kromatogram Şekil 35’ de verilmiştir.



Şekil 35. Bazik hidroliz sulu fraksiyonunun (FBW) 315 nm’ deki kromatogramı

3.3. Toplam Antioksidan Bileşiklerin Aktivitesi ve Tayini

DPPH• radikal temizleme aktivite sonuçlarına bakıldığında standart olarak kullanılan gallik asit, epikateşin, kateşin ve kuersetin standartları içinde gallik asit'in temizleme aktivitesinin (0,95 µg/mL) diğerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Kateşin'in ise bu standartlar içinde en düşük temizleme aktivitesine (4,66 µg/mL) sahip olduğu görülmektedir. Bu standartlar eşliğinde metanol ekstraktının ve metanol ekstraktından elde edilen bütün fraksiyonların içinde radikal temizleme aktivitesinin en iyi olduğu belirlenen fraksiyon bazik hidroliz organik (7,24 µg/mL) kısmıdır (Tablo 10).

Toplam fenol içeriği, bazik hidroliz organik fraksiyonunda (828,88 mg/mL) en yüksek bulunurken, metanol ekstraktının sulu fraksiyonunda (57,84 mg/mL) en düşük bulunmuştur (Tablo 10).

Asidik hidroliz organik fraksiyonunda toplam flavonoid içeriği-1(22,58 mg/mL) en yüksek bulunurken metanol ekstraktının etilasetat fraksiyonunda toplam flavonoid içeriği-2 (73,42 mg/mL) en yüksek bulunmuştur (Tablo 10).

Toplam fenolik madde sonuçlarının gallik asit ve epikateşin cinsinden hesaplanan değerleri arasında yüksek korelasyon (0,99) gözlenmiştir. Toplam flavonoid içeriği-2 sonuçlarının kuersetin, epikateşin ve kateşin cinsinden elde edilen miktarların kendi aralarında yüksek korelasyona sahip oldukları tespit edildi (0,99). Toplam flavonoid içeriği 1 ve 2' nin korelasyonu 0,72 bulunurken toplam fenol ile toplam flavonoid içeriği-2' nin korelasyonu 0,47 bulundu. DPPH• ile toplam antioksidan içerikleri arasında yapılan karşılaştırmada en yüksek korelasyon toplam fenolik madde ile bulunurken (-0,64) toplam flavonoid içeriği 1 ve 2' deki korelasyon değerleri sırasıyla -0,29 ve -0,40 bulundu.

Toplam fenol ve flavonoid içeriği ile DPPH• radikal temizleme aktivitesinin sonuçları Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10. TP içeriği, TF içeriği ve DPPH radikal temizleme aktivite sonuçları

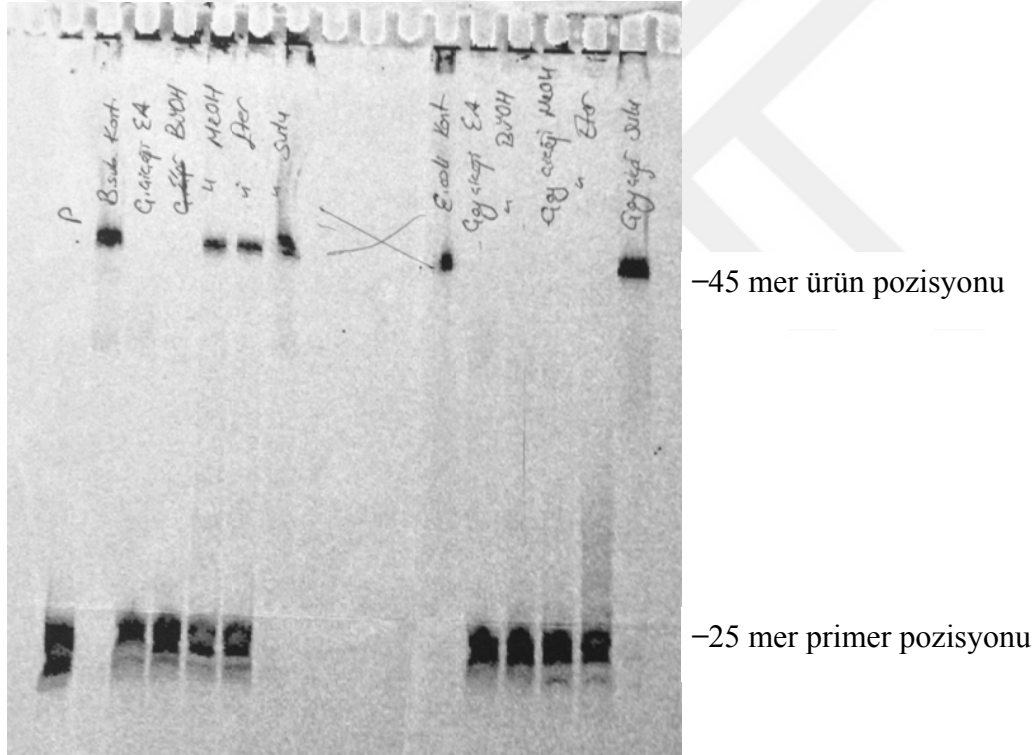
Ekstrakt / Std	DPPH• (µg/mL)			TP İçeriği (mg /g ekstrakt)			TF İçeriği -1 (mg /g ekstrakt)			TF İçeriği -2 (mg /g ekstrakt)				
	SC ₅₀	Std Sapma	G.A.	Std Sapma	EC	Std Sapma	Kuer	Std Sapma	C	Std Sapma	EC	Std Sapma	Kuer	Std Sapma
<i>FM</i>	35,05	1,20	191,87	4,56	49,57	0,91	5,45	0,87	30,86	0,33	24,41	0,29	109,63	1,08
<i>FE</i>	30,46	1,35	198,46	1,25	56,64	0,00	13,79	0,90	44,68	0,96	37,65	0,84	149,87	3,08
<i>FEa</i>	15,01	0,63	547,38	1,54	160,31	2,02	9,45	0,04	73,42	1,37	62,82	1,20	242,71	4,41
<i>FB</i>	49,08	2,13	515,78	3,58	148,63	1,24	21,15	0,34	64,96	0,39	55,15	0,35	216,41	1,27
<i>FW</i>	116,30	2,48	57,84	0,70	16,55	0,15	1,98	0,12	6,43	0,04	5,55	0,03	21,08	0,13
<i>FAO</i>	14,34	0,82	229,15	4,14	60,32	2,23	22,58	0,49	44,17	0,38	37,59	0,33	146,77	1,22
<i>FAW</i>	62,94	13,39	74,01	1,76	20,43	0,44	4,72	0,17	4,82	0,04	3,93	0,03	16,64	0,12
<i>FBO</i>	7,24	0,13	828,88	8,02	235,31	3,55	10,24	0,28	40,44	0,47	34,21	0,41	135,17	1,522
<i>FBW</i>	7,46	2,74	514,89	2,22	141,55	0,82	0,57	0,02	1,01	0,02	0,78	0,02	3,642	0,072
<i>G.A.</i>	0,95	0,25												
<i>EC</i>	2,45	0,29												
<i>C</i>	4,66	0,21												
<i>Kuer</i>	1,36	0,15												

G.A.: Gallik asit; C: Kateşin; EC: Epikateşin; Kuer: Kuersetin

3.4. Çay Çiçeği Ekstraktlarının DNA Polimeraz Enzim İnhibisyonu

Çay çiçeğinin çeşitli çözücülerle yapılan ekstraksiyon sonucunda inhibisyon bakıldığında, etil asetat, bütanol özütlerinde ürün oluşmadığı için *B. subtilis* PolC enzimi üzerine güçlü bir inhibisyon etkisi olduğu görülmektedir. Çay çiçeğinin eter, metanol ve sulu örneklerinde ise *B. subtilis* PolC proteini üzerine inhibisyon etkisi yoktur.

Çay çiçeğinin *E. coli* DnaE proteini üzerinde inhibisyon etkisine bakıldığında sadece sulu özütünde inhibisyon olmayıp; etil asetat, bütanol, metanol ve eter özütlerinde güçlü bir inhibisyon olduğu görülmektedir (Şekil 36).



Şekil 36. Çay çiçeğinin DNA polimeraz üzerindeki inhibisyon sonucu

3.5. Çay Çiçeği Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

Çay çiçeğinin metanol ekstraktı ile eter, etilasetat, bütanol ve fraksiyonlarının kontrol ilaç olarak seçilen ampisilin ile karşılaştırmalı olacak şekilde inhibisyon zon çapları hesaplandı (Tablo 11). Etilasetat fraksiyonunun seçili bakteriler üzerindeki zon çapları

en fazla iken sulu fraksiyon zon çapı oluşturmamıştır. Etil asetat ve bütanol fraksiyonlarının *Bacillus cereus* bakterisine karşı inhibisyonu kontrol ilaçtan daha yüksek bulundu. Bu fraksiyonların gram (-) olan *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı inhibisyon zonları tüm seçilen bakteriler içinde en yüksektir.

Tablo 11. Çay çiçeğinin farklı ekstraktlar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri

Ekstraktlar (DMSO)	Mikroorganizmalar						
	Gram Pozitif				Gram Negatif		
	<i>B. c</i>	<i>S. a</i>	<i>E. f</i>	<i>Y. p</i>	<i>E. c</i>	<i>S. t</i>	<i>P. a</i>
FM (20 mg/0,5 mL)	6 mm	-	-	-	-	-	-
FE (111 mg/1 mL)	6 mm	-	-	6 mm	-	-	-
FEa (21 mg/0,5 mL)	12 mm	12 mm	-	10 mm	8 mm	6 mm	14 mm
FB (300 mg/1 mL)	10 mm	6 mm	-	10 mm	6 mm	-	12 mm
FW (400 mg/1 mL)	-	-	-	-	-	-	-
Ampisillin (0,1 mg)	8 mm	38 mm	33mm	16 mm	24 mm	32 mm	20 mm

B. c: *Bacillus cereus*, *S. a*: *Staphylococcus aureus*, *E. f*: *Enterococcus faecalis*, *Y. p*: *Yersinia pseudotuberculosis*, *E. c*: *Escherichia coli*, *S. t*: *Salmonella typhimurium*, *P. a*: *Pseudomonas aeruginosa*, -: etki görülmedi

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çay (*Camellia sinensis*) çiçeğinin metanol ekstraktını ve bundan elde edilen sıvı sıvı fraksiyonlarını incelediğimizde etilasetat ve bütanol fraksiyonlarının hem PolC hem de DnaE üzerindeki inhibisyonlarının flavan-3-ollerce (EGCG) zengin olmalarından kaynaklandığı Tablo 21’deki HPLC ve spektrofotometrik analiz sonuçlarından görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda, EGCG gibi monomerik flavan-3-O-gallatlar DNA polimeraz inhibitörleri olarak bilinirken monomerik kateşin ve epikateşinin inhibitör etkileri gözlenmedi. Flavan-3-O-gallatların inhibitör etkilerinin yapılarındaki galloil gruplarından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Flavan-3-ollere bağlı 3-O-galloil grupları DNA replikatif polimeraz olan DNA polimeraz α 'yı aktif bir şekilde inhibe eder. DNA polimeraz α 'nın kanser hücrelerinin çoğalması için vazgeçilmez olan DNA replikasyonunda önemli bir role sahip olmasından dolayı bazı anti kanser ilaçlarının hedefindedir (Kornberg ve Baker 1992; Saito vd., 2004; Mizushina vd., 2005; Sakuda vd., 2006).

Tablo 12. Sıvı- sıvı ekstraksiyonun HPLC- DAD ile Spektrofotometrik analiz sonuçlarının karşılaştırılması

	Toplam miktarı verilen özellik	^a FM	^a FE	^a FEa	^a FB	^a FW
HPLC Analizleri	Fenolik asit	1,45	3,90	7,94	4,88	0,73
	Flavan-3-oller	34,47	42,13	81,99	60,72	9,43
	Diğer flavonoidler	5,04	1,62	2,84	19,61	1,11
	kateşin+ diğer flavonoidler	39,51	43,75	84,83	80,33	10,54
Spektrofotometrik Analizler	Polifenol içeriği	49,57	56,64	160,31	148,63	16,55
	Flavonoid içeriği-1	5,45	13,79	9,45	21,15	1,98
	Flavonoid içeriği-2	24,41	37,65	62,82	55,15	5,55

a: mg/g ekstrakt

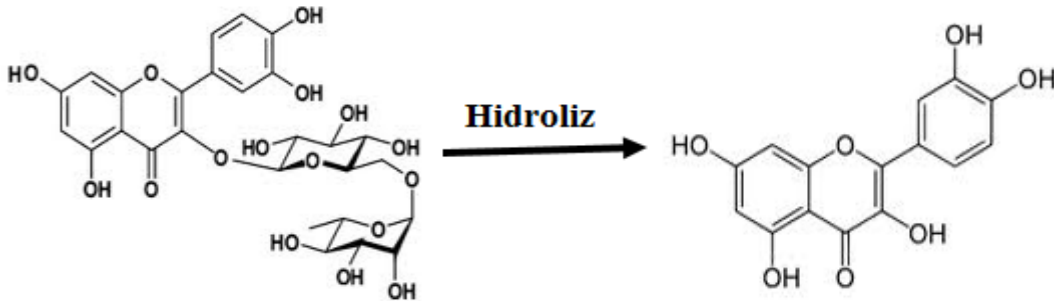
Camellia sinensis çiçek ekstraktlarının sıvı sıvı ekstraksiyon ile asidik ve bazik hidrolizli ekstraksiyon olarak iki grupta ele aldığımızda ise hidroliz uygulanan fraksiyonlardaki flavanoid özellikle flavan-3-ol (kateşin, epikateşin, EGCG) ve flavon (luteolin) içeriğinin yüksek olduğunu görüyoruz (Tablo 12 ve Tablo 13). Kateşin ve luteolin türevleri hemen hemen bütün ekstraktlarda görüldüğü için çay çiçeğinin başlıca fenolik bileşenlerinin bu iki türden oluştuğunu söyleyebiliriz.

Tablo 13. Hidroliz ekstraksiyonlarının HPLC-DAD ile Spektrofotometrik analiz sonuçlarının karşılaştırılması

	Toplam miktarı verilen özellik	^a FAO	^a FAW	^a FBO	^a FBW
HPLC Analizleri	Fenolik asit	10,32	0,11	29,87	0,11
	Flavan-3-oller	94,35	13,50	10,84	0,03
	Diğer flavonoidler	3,83	0,92	3,18	0,35
	kateşin+ diğer flavonoidler	98,18	14,42	14,02	0,38
Spektrofotometrik Analizler	Polifenol içeriği	60,32	20,43	235,31	141,55
	Flavonoid içeriği-1	22,58	4,72	10,24	0,57
	Flavonoid içeriği-2	37,59	3,93	34,21	0,78

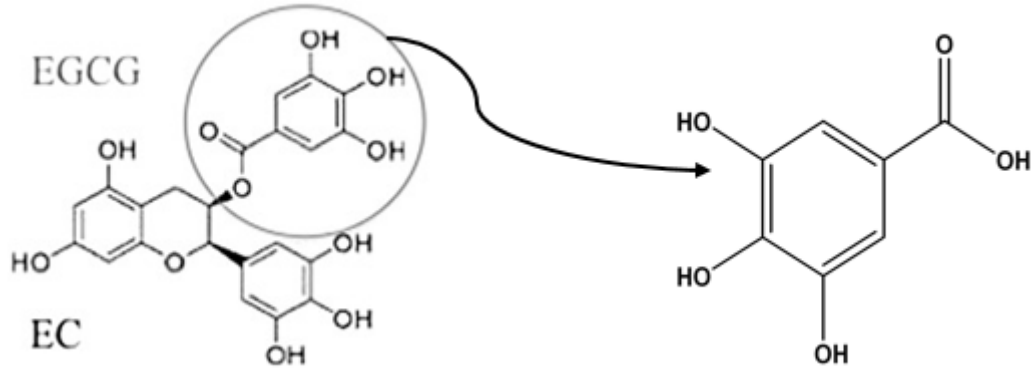
a: mg/g ekstrakt

Hidroliz işlemi sonucunda bazı büyük moleküllerdeki ester ve glikozidik bağlar kırılarak basit yapılı moleküller ortaya çıkar. Örneğin kondense tanenler onları oluşturan kateşin ya da epikateşinlere parçalanabilirler. Hatta EGCG, hidroliz sonucunda epikateşin ve gallik asit oluşacak şekilde parçalanabilir. Aynı şekilde glikozidik flavonoidlerin de şekerlerle yaptıkları bağlar kırılarak çekirdek flavonoidler açığa çıkabilir. Örnek olarak rutinden rutinozid şekerinin ayrılması sonucu kuersetinin ortaya çıkması verilebilir (Şekil 37).



Şekil 37. Rutin' in Kuersetin' e parçalanması

Aynı şekilde metanol ekstraktında ve sıvı sıvı ekstraksiyonun bütün fraksiyonlarında düşük miktarda tespit edilen gallik asitin, asidik ve bazık hidroliz sonrasında miktarında artış tespit edilmesinin nedeni olarak EGCG'in asit ve baz ile muamelesinden sonra yapısında bulunan gallat formunun parçalanmasıdır (Şekil 38).

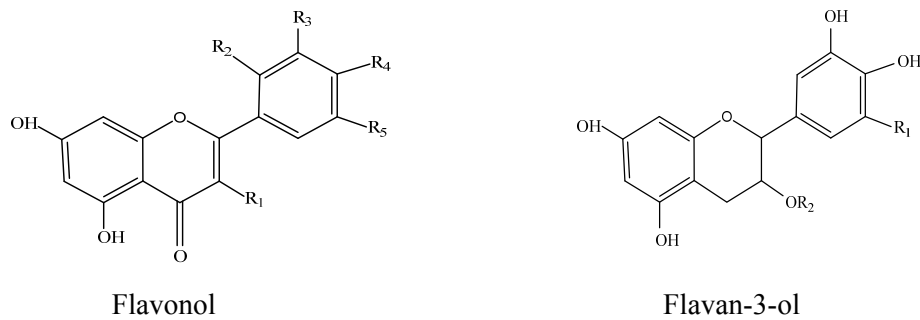


Şekil 38. EGCG' tan gallik asit' in ayrılması reaksiyonu

DPPH• radikal temizleme aktivitesinin bazik hidroliz organik fraksiyonunda yüksek olması toplam polifenol içeriğinin yüksek olmasıyla orantılıdır. Spektrofotometrik analiz sonucunda toplam polifenol içeriğinin bazik hidroliz organik fraksiyonunda yüksek bulunması bu ilişkiyi doğrulayıcı niteliktedir (Tablo 13).

Toplam flavonoid içeriğini belirlemek için kullanılan iki yöntemin (toplam flavonoid içeriği-1 ve toplam flavonoid içeriği-2), radikal temizleme aktivitesiyle orantılı bulunmaması aralarındaki korelasyonun düşük olmasından anlaşılmaktadır (bkz. Bölüm 3.3).

Toplam flavanoid içeriği-1 testinde sadece flavonları ve flavonollerini tayin edebilmemizin sebebi Al^{+3} ile flavon ve flavonolların C-4 keto grubu ve C-3 ya da C-5 hidroksil gruplarından biriyle kararlı kompleksler oluşturmasıdır (Şekil 39).



Şekil 39. Flavonol ve Flavan-3-ol genel yapıları

Fakat Flavan-3-ollerde C-4 keto grubunun olmaması Al^{+3} ile kompleks oluşturamamasına neden olmaktadır (Şekil 39). Bundan dolayı flavonoid içeriği-2 yöntemi flavan-3-ollere duyarlı olduğu için kullanıldı.

Toplam flavonoid içeriği-1' de, flavonol sınıfından olan kuersetin standartı cinsinden asidik hidroliz organik fraksiyonu en yüksek bulunurken bazik hidroliz su fraksiyonu en düşük bulunmuştur. Toplam flavonoid içeriği-2'de ise, sıvı sıvı ekstraksiyonun etilasetat fraksiyonunda en yüksek, bazik hidroliz sulu fraksiyonunda ise en düşük içeriğe sahip olduğu görölmektedir (Tablo 12-13).

Baz hidrolizli ekstraksiyon, asit hidrolizli ekstraksiyondan daha agresiftir (Luthria ve Pastor-Corrales, 2006; Mattila ve Kumpulainen, 2002). Bu veri doğrultusunda Tablo 21' de verilmiş olan asidik ve bazik hidroliz ekstraksiyonlarının spektrofotometrik analiz sonuçlarına baktığımızda baz hidrolizli ekstaksiyon içeriğinin asit hidrolizli ekstraksiyondan daha yüksek olduğunu görmekteyiz. Bu sonuç büyük yapılı polifenollerin çay çiçeği ekstraktlarında oldukça fazla bulunduğunu göstermektedir.

Antimikrobiyal aktivite polifenol içeriğiyle ilişkilidir (Chung, vd., 1998). Antimikrobiyal aktivitenin en iyi olduğu sıvı sıvı ekstraksiyonun etilasetat fraksiyonunda gözlenmesi ve aynı şekilde etilasetat fraksiyonun polifenol içeriğinin diğer sıvı sıvı ekstraksiyonunun fraksiyonlarından daha yüksek bulunması ilişkiyi doğrulamaktadır (Tablo 20-21).

Pek çok klinik öncesi araştırmada, luteolin'in antioksidan, anti-kanser ve anti-inflamatuar aktiviteler de dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. Luteolin'in akciğer kanserini, güçlü serbest radikal temizleme, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-proliferatif etkiler yoluyla engellediğini ve dolayısıyla luteolin'in, insan akciğer kanseri riskini azaltmak için bir ilaç olarak geliştirilebileceği gösterilmiştir. Aynı şekilde flavan-3-ol grubunda yer alan kateşinin de sağlık üzerine antioksidatif, anti-tümör ve anti-inflamatuar etkiler gibi birçok yararı olduğu gösterilmiştir (Gupta vd., 2002; Higdon ve Frei, 2003; Lopez-Lazaro, 2009; Braicu vd., 2013; Kasala vd., 2016; Kwon, 2017). Yapılmış olan bu çalışmaların öncülüğünde kateşin ve luteolin içeriği fazla olan çay çiçeğinin oldukça değerli bir doğal şifa kaynağı olduğunu söyleyebiliriz.

5. ÖNERİLER

Çay bitkisinin yapraklarından yapılan çay, dünya genelinde sudan sonra en çok tüketilen içecektir. Çay yapraklarının biyoaktif içeriklerinin sağlık üzerine yararlı özellikleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Dufresne ve Farnworth, 2001; Ferrara vd., 2001; Kobayashi vd., 2006; Pastore ve Fratellone, 2006; Zhu vd., 2006; Hsieh ve Chen, 2007; Khan ve Mukhtar, 2007; Chen vd., 2008; Wang vd., 2008). Çay yapraklarına ek olarak çay çiçekleri özütleri takviye ilaçlarda, cilt bakımı, öksürük kesici ve balgam söktürücü ve koku giderici olarak Çin’ de kullanılan değerli bir kaynaktır. Farmokolojik araştırmalar, çay çiçeği özütünün zeytin yağı ile tedavi edilen farelerde serum trigliserit yükselmesi üzerine inhibe edici etkiye, insan göğüs kanseri MCF-7 hücrelerinde apoptotik etkiye, süperoksit anyonunu azaltıcı ve inhibe edici, DPPH ve hidroksil serbest radikallerini temizleyici gibi iyi antioksidatif etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Yoshikawa vd., 2008b; Yoshikawa vd., 2005, Way vd., 2009, Yang vd., 2007; Zhang vd., 2007).

İnhibisyon sonuçlarından yola çıkılarak çay çiçeğinin inhibisyon etkisi gösteren fraksiyonlarının preparatif HPLC-DAD sisteminde yürütülüp her bileşenin ayrı ayrı toplanarak inhibisyonun hangi bileşenden kaynaklandığı bulunabilir. Eğer bu bileşen yapısı bilinmeyen bir bileşen ise MS, NMR, IR spektrumlarına başvurularak yapısı aydınlatılabilir. İnhibisyon gösteren bileşenlerin antioksidan ve antimikrobiyel özellikleri test edilebilir. Kateşin ve luteolin türevlerince zengin olan çay çiçeğindeki bu türevlerin neler olduğu aydınlatılarak bu bileşenlerin insan sağlığı üzerinde ne gibi yararları olduğu hücre kültürü ve hayvanlar üzerindeki deneylerle test edilip, ilaç etken maddesi olarak araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abdille, M.H., Singh, R.P., Jayaprakasha, G.K. and Jena, B.S., 2005.** Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. Food Chemistry, 90, 891–896. 119.
- Akyuz Turumtay, E., Islamoglu, F., Cavus, D., Sahin, H. ve 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.
- Akyuz, E., Sahin, H., Islamoglu, F., Kolayli, S. ve Sandra, P., 2014.** Evaluation of Phenolic Compounds in *Tilia rubra* subsp. *caucasica* by HPLC-UV and HPLC-UV-MS/MS. International Journal of Food Properties, 17, 331–343.
- Amr, A. and Al-Tamimi, E., 2007.** Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. Journal of Food Science and Technology, 42, 985–991.
- Bag, G.C., Grihanjali Devi, P. and Bhaigyabati, Th., 2015.** Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three hedychium species of manipur valley. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 30 (1), 154-159.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Saman, S., 2006.** Phenolic compounds in plants agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99, 191-203.
- Başer, H.C., 2002.** Fonksiyonel gıdalar ve nutrasotikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.
- Bavaresco, L., 2003.** Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. Drugs under Experimental and Clinical Research, 29, 181–187.
- Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M., 1999.** Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longoc, L. and Rescioa, L., 2008.** An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. Separation and Purification Technology, 64, 192–197.

- Braicu, C., Ladomery, M.R., Chedea, V.S., Irimie, A. and Berindan-Neagoe, I., 2013.** The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food chemistry*, 141 (3), 3282-3289.
- Bravo, L., 1998.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- Budak, E.E., 2016.** E. coli replikatif DNA polimeraz III α (DNAE)'ye inhibisyon etkili bitki organ özütlerinde fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile aydınlatılması. RTEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi.
- Bureau, S., Renard, C.M.G.C., Reich, M., Ginies, C. and Audergon, J.M., 2009.** Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *Food Science and Technology*, 42, 372–377.
- Can, Z., Yıldız, O., Şahin, H., Turumtay, E., Silici, S. ve Kolaylı, S., 2015.** An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry* 180, 133–141.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, Ma. de Lourdes, Pérez-Hernández, Ma. Elena, Rodríguez, J.A. and Galán-Vidal, C.A., 2009.** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Cemeroğlu, B., 2004.** Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara, 77-88.
- Chen, H., Zhang, M., Qu, Z., Xie, B., 2008.** Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). *Food Chemistry*, 106, 559–563.
- Clifford, M.N., 2000.** Anthocyanins–nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 ,1063-1072.
- Corrales, M., Fernández García, A., Butz, P. and Tauscher, B., 2009.** Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415–421.
- Coşkun, F., 2006.** Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (2) 27-33.
- Dastmalchi, K., Damien Dorman, H.J., Kosar, M. and Hiltunen, R., 2007.** Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *LWT- Food Science and Technology*, 40, 239–248.

- Dimitrios, B., 2006.** Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 17 (9), 505-512.
- Du, Q., Zheng, J. and Xu, Y., 2008.** Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 390-395.
- Dufresne, C.J. and Farnworth, E.R., 2001.** A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 404–421.
- Erdman, J.W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Foltz, 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.
- Escarpa, M. and Gonzalez, C., 2001.** Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectro photometric method. *Analytica Chimica Acta*, 427, 119–127.
- Ferrara, L., Montesano, D., Senatore, A., 2001.** The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Il Farmaco*, 56, 397–401.
- Giachetti, C., Tognolo, C., Gnemi, P. and Tenconi, A., 1999.** Simultaneous Determination of trans- and cis- Resveratrol in Spiked Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Photo-Diode Array Uv-Vis and Fluorimetric Detection. *Chromatographia*, 50, 9-10.
- 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.
- Guliyev, V.B. and Harmandar, M., 2003.** *Flavonoidler*, İstanbul: Aktif Yayınevi
- Gupta, S., Saha, B. and Giri, A.K., 2002.** Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 512 (1), 37-65.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S. And Fukui, S., 1994.** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 845-850.

- Higdon, J.V. and Frei, B., 2003.** Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (1), 89–143.
- Hsieh, M.M. and Chen, S.M., 2007.** Determination of amino acids in tea leaves and beverages using capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection. *Talanta*, 73, 326–331.
- 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.
- Ignat, I., Volf, I. and Popa, V.I., 2011.** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821–1835.
- Joshi, R. and Gulati, A., 2011.** Biochemical attributes of tea flowers (*Camellia sinensis*) at different developmental stages in the Kangra region of India. *Scientia Horticulturae*, 130, 266–274.
- Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T., 1998.** Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799 (1–2), 101–110.
- Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Barua, C. and Gogoi, R., 2016.** Antioxidant and antitumor efficacy of Luteolin, a dietary flavone on benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 82 (8), 568-577.
- Khan, N. and Mukhtar, H., 2007.** Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81, 519–533.
- Kobayashi, K., Teruya, T., Suenaga, K., Matsui, Y., Masuda, H. and Kigoshi, H., 2006.** Isotheasaponins B1–B3 from *Camellia sinensis* var. *sinensis* tea leaves. *Phytochemistry*, 67, 1385–1389.
- Kornberg, A. and Baker, T., 1992.** DNA Replication. Freeman, W.H., New York, Edition 2, Chapter 6, 197–225.
- Kwon, Y., 2017.** Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's diseases. *Experimental Gerontology*, 95 (9), 39-43.

- Li, C. and Xie, B., 2000.** Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea oxypolimers. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6362-6366.
- Lopez-Lazaro, M., 2009.** Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. Mini Review. *Medicinal Chemistry*, 9 (1), 31–59.
- Luthria, D.L. and Pastor-Corrales, M.A., 2006.** Phenolic acids content of 15 dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205–211.
- Ma, Y.Q., Chen, J.C., Liu, D.H. and Ye, X.Q., 2009.** Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonic Sonochemistry*, 16(1), 57–62.
- Marcucci, M.C., Woisky, R.G., Salatino, A., 1998.** Use of aluminum chloride in the flavonoids quantification of propolis samples. *Mensagem Doce* 46.
- Mattila, P. and Kumpulainen, J.J., 2002.** Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3660–3667.
- McCord, J. M., 2000.** The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 108, 8, 652-659.
- Memişoğulları, R., 2005.** Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Dicle Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Memon, A.A., Memon, N., Bhangar, M.I. and Luthria, D.L., 2013.** Assay of phenolic compound from four species of ber (*Ziziphus mauritiana* L.) fruits: Comparison of three base hydrolysis procedure for quantification of total phenolic acids. *Food chemistry*, 139, 496-502.
- Meral, R., Doğan, İ.S. ve Kanberoğlu G.S., 2012.** Iğdır Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi / Iğdır. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 2 (2), 45-50.
- Merken, H.M. and Beecher, G.R., 2000.** Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577–599.
- Miadokova, E., 2009.** Isoflavonoids – an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology*, 2 (4), 211-218.

- Midilli, A., 2016.** *Diospyros kaki* yaprak ve meyve özütlerinin gram (+) replikatif DNA polimeraz (PolC) üzerine inhibisyonunun araştırılması. RTEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi.
- Mizushina, Y., Saito, A., Tanaka, A., Nakajima, N., Kuriyama, I., Takemura, M., Takeuchi, T., Sugawara, F. and Yoshida, H., 2005.** Structural analysis of catechin derivatives as mammalian DNA polymerase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333 (1), 101-109.
- Molyneux, P., 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
- Mora, A., Pay, M., Rios, J.L. and Alcaraz, M.J., 1990.** Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 40, 793-797.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J. and Parajo J.C., (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72 (2), 145-171.
- Naczk, M. and Shahidi, F., 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. . *Journal of Chromatography A*, 1054 (1-2), 95-111.
- Naczk, M. and Shahidi, F., 2004.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.
- 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.
- Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., Barros, M.P. and Mano, C.M., 2009.** Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, 115, 469-475.
- Pastore, R.L. and Fratellone, P., 2006.** Potential health benefits of green tea (*Camellia sinensis*): a narrative review. *Diet and Nutrition*, 2, 531–539.
- Peterson, J. and Dwyer, J., 1998.** Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18, 1995-2018.

- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M.J. and Nicoli, M.C. 2005.** Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92, 109–117.
- Porter, L.J., 1989.** Tannins. In J.B. Harborne (Ed.), *Methods in plant biochemistry*. Plant Phenolics, 1, 389–419.
- Ratty, A.K. and Das, N.P., 1988.** Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 39 (1), 69-79.
- Rebaya, A., Belghith, S.I., Baghdikian, B., Leddet, V.M., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif, J.K. and Ayadi, M.T., 2014.** Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content and Antioxidant Capacity of *Halimium Halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5 (01), 052-057.
- 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. and Paganga, G., 1997.** Reviews: Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-158.
- Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Goojier, C. and Brinkman, U.A., 2006.** Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.
- Ross, K.A., Beta, T. and Arntfield, S.D., 2009.** A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113, 336–344.
- Saito, A.; Emoto, M.; Tanaka, A.; Doi, Y.; Shoji, K.; Mizushina, Y.; Ikawa, H.; Yoshida, H.; Matsuura, N.; Nakajima, N., 2004.** Stereoselective synthesis of procyanidin B3–3-O-gallate and 3,3"-di-O-gallate, and their abilities as antioxidant and DNA polymerase inhibitor. *Tetrahedron*, 60, 12043–12049.
- Sakuda, H.; Saito, A.; Mizushina, Y.; Ikawa, H.; Yoshida, H.; Tanaka, A.; Nakajima, N., 2006.** Synthesis of galloyl-substituted procyanidin B4 series, and their DPPH radical scavenging activity and DNA polymerase inhibitory activity. *Heterocycles*, 67, 175–188.
- Saldamlı, İ., 2007.** Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.

- Sandalli, C., Singh, K., Modak, M.J., Ketkar, A., Canakci, S., Demir, I. ve Beldüz, A.O., 2009.** A new DNA polymerase I from *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4: cloning, characterization and mutational analysis of two aromatic residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (1), 105-117.
- Sandalli, C., Buruk, C.K., Sancaktar, M., Ozgumus, O.B., 2010.** Prevalence of integrons and a new *dfrA17* variant in Gram-negative bacilli which cause community acquired infections. *Microbiology and Immunology*, 54 (3), 164-9.
- Sethna, S.M. and Shah, N.M., 1944.** The Chemistry of Coumarins. *Chemical Reviews*, 36, 1-62.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substances by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Siro I. Trevisanato, and Young-In Kim, M.D., 2000.** Tea and Health. *Nutrition Reviews*, 58 (1), 1-10.
- Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P., 1986.** Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25 (2), 383-385.
- URL-1, 2017.** <http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yukse-performansli-sivikrom-atog-rafi-si-hplc-> (9 Mayıs 2017).
- URL-2, 2017.** http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf (9 Mayıs 2017).
- URL-3, 2017.** <http://www.caykur.gov.tr/CMS/Design/Sources/UnitePCKYSDokumanlari/7877.pdf>. (13 Mayıs 2017).
- URL-4, 2017.** http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=2010. (15 Haziran 2017).
- URL-5, 2017.** http://www.bayar.edu.tr/besergil/3_kromatografi_dedektorleri.pdf. (15 Haziran 2017).
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Vals, J., Richard, T., Delaunay, J.C., Merillon, J.M. and Teissédre, P.L., 2005.** Determination of stilbenes (*l*-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, *ε*-viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5664-69.

- Wang, D., Lu, J., Miao, A., Xie, Z. and Yang, D., 2008.** HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 361–369.
- Way, T.D., Lin, H.Y., Hua, K.T., Lee, J.C., Li, W.H., Lee, M.R., Shuang, C.H. and Lin, J.K., 2009.** Beneficial effects of different tea flowers against human breast cancer MCF-7 cells. *Food Chemistry*, 114, 1231–1236.
- Xu, R., Ye, H., Sun, Y., Tu, Y. and Zeng, X., 2012.** Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2473–2480.
- Yang, Z., Tu, Y., Baldermann, S., Dong, F., Xu, Yi. and Watanabe, N., 2009.** Isolation and identification of compounds from the ethanolic extract of flowers of the tea (*Camellia sinensis*) plant and their contribution to the antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1439–1443.
- Yang, Z., Xu, Y., Jie, G., He, P. and Tu, Y., 2007.** Study on the antioxidant activity of tea flowers (*Camellia sinensis*). *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 148–152.
- Yılmaz, Y. and Toledo, R.T., 2006.** Health aspects of functional grape seed constituents. *Food Science and Technology*, 15, 422–433.
- Yoshikawa, M., Morikawa, T., Yamamoto, K., Kato, Y., Nagatomo, A. and Matsuda, H., 2005.** Floratheasaponins A–C, acylated oleanane-type triterpene oligoglycosides with anti-hyperlipidemic activities from flowers of the tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Natural Products*, 68, 1360–1365.
- Yoshikawa, M., Wang, T., Sugimoto, S., Nakamura, S., Nagatomo, A., Matsuda, H. and Harima, S., 2008.** Functional saponins in tea flower (flower buds of *Camellia sinensis*): gastroprotective and hypoglycemic effects of floratheasaponins and qualitative and quantitative analysis using HPLC. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 128, 141–151.
- Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J. and Yong, J., 1990.** Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 19–21.
- Zhang, H.C., Li, H.Y., Dong, J., Li, C.Y., Wen, J., 2007.** Research on antioxidation of enzymatic hydrolysate of protein from *Camellia* flower. *Food Science*, 28, 58–61.

Zhu, Y.X., Huang, H. and Tu, Y.Y., 2006. A review of recent studies in China on the possible beneficial health effects of tea. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 333–340.



ÖZGEÇMİŞ

Havva ER 1989 yılında Rize’ de doğdu. Öğrenimine Ulucami İlköğretim Okulu’nda başladı ve Kurtuluş İlköğretim Okulu’nda devam etti. Fener Yabancı Dil Ağırlıklı Süper Lisesi’ nde liseyi tamamladı. 2009-2010 Eğitim-Öğretim yılında Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’ nde lisans öğrenimine başladı. 2014 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’ nden mezun oldu. Aynı yıl Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’ nda lisanüstü eğitimine başladı. İngilizcesi iyi derecededir.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları

Akyüz Turumtay, E., Kılıçkaya Selvi, E., Er, H., Demir, A., Midilli, A., Budak, E.E., Baykal, H., Beldüz, A.O. ve Sandallı, C., 2015. Phenolic compounds of *Cinnamomum zeylanicum* and inhibition effect on the enzymes of bacterial replicative DNA polymerase. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (Sözlü Bildiri)

Sandallı C., Midilli A., Budak E.E., Akyüz Turumtay E., Er H., Baykal H., et al., 2015. Üç *Sorbus* Türünün Meyve ve Yaprak Özütlerinin Bakteriyal Replikatif DNA Polimeraz III Enzimleri Üzerine İnhibisyonunun Karşılaştırmalı Araştırılması, 3. İlaç Kimyası Kongresi, Antalya, Türkiye, 204-204.

Turumtay, H., Midilli, A., Akyuz Turumtay, E., Demir, A., Kılıckaya Selvi, E., Budak, E.E., Er, H., Kocaimamoğlu, F., Baykal, H., Belduz, A.O., Atamov, V. ve Sandallı, C., 2016. Gram (-) microorganisms DNA polymerase inhibition, antibacterial and chemical properties of fruit and leaf extracts of *Sorbus acuparia* and *Sorbus caucasica* var. *yaltirikii*. Biomedical Chromatography, e3901, DOI: 10.1002/bmc.3901