



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***PRİMULA VULGARİS* (ÇUHA ÇİÇEĞİ)
EKSTRAKTLARININ HPLC İLE
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK
AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

Mehtap Tuğçe ÖZKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2015

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU

Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mehtap Tuğçe ÖZKAN'ın hazırladığı “*Primula vulgaris* (Çuha Çiçeği) Ekstraktlarının HPLC ile Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

Tarih: .. /.. /2015

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun /... /.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

11/03/2015

Mehtap Tuğçe ÖZKAN

TEŞEKKÜR

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU'na;

Örneklerimin toplanması için her türlü desteği sağlayan Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ'ye;

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren çalışmalarında bana yol gösteren ve desteklerini benden esirgemeyen saygı değer hocalarım Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN'e;

Gerek HPLC tekniklerinin öğretilmesinde ve gerekse de HPLC ve diğer analizlerimin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam; Yrd.Doç.Dr. Zehra CAN'a;

Tez yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı arkadaşlarım Gonca TAŞKIN ve Ozan SAĞIR'a;

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Mehtap Tuğçe ÖZKAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. <i>Primula vulgaris</i> Hakkında Genel Bilgi	4
4.2. Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanılması	5
4.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	6
4.3.1. Doğal Antioksidanlar	12
4.3.1.1. E Vitamini	12
4.3.1.2. Karotenoidler	13
4.3.1.3. C Vitamini (Askorbik asit)	14
4.4. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler	15
4.4.1. Fenolik Bileşikler	15
4.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	18
4.5.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TP)	19
4.5.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kapasite Testi (FRAP)	19
4.5.3. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi	20
4.6. Bitki Bileşenlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler	21
4.6.1. Kromatografik Yöntemler	21
4.6.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	22
4.6.1.1.1. Ultraviyole (UV) Dedektör	25
4.6.1.1.2. Fotodiyot Dizisi (DAD) Dedektör	26
4.6.1.1.3. Refraktif İndeks (RID) Dedektör	26
5. YAPILAN ÇALIŞMALAR	28

5.1. Kullanılan Cihazlar	28
5.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	28
5.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	29
5.4. Bitkinin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması	30
5.4.1. Döner Vakum Evaporatörü İle Çözücü Uçurulması	30
5.5. RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini	31
5.5.1. RP-HPLC-UV Koşulları	31
5.6. Çalışmada Kullanılan Antioksidan Yöntemler	32
5.6.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı	32
5.6.2. FRAP Tayini	32
5.6.3. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini	33
5.6.3.1. SC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	34
5.6.4. İstatistiksel Analiz	34
6. BULGULAR	35
6.1. Toplam Polifenol Testi Sonucu	35
6.2. FRAP Testi Sonucu	37
6.3. DPPH• Testi Sonucu	39
6.3.1. DPPH Aktivitesi İçin SC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması	41
6.4. RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Sonuçları ve Kromatogramları	47
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
8. ÖNERİLER	57
9. KAYNAKLAR	58
10. ÖZGEÇMİŞ	67

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve özellikleri	7
Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve marka/modelleri	28
Tablo 3. Kullanılan kimyasallar ve satın alınan firma	28
Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltiler	29
Tablo 5. Çalışmada kullanılan bitki türleri, kodları ve toplanma bölgeleri	30
Tablo 6. RP-HPLC-UV gradient programı	31
Tablo 7. Toplam polifenolik tayininde yapılan pipetleme işlemi	32
Tablo 8. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemi	33
Tablo 9. DPPH yöntemi için pipetleme işlemi	34
Tablo 10. Trabzon'un değişik bölgelerinden toplanan <i>Primula vulgaris</i> örneklerinin sulu ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerleri (Ort±SP)	40
Tablo 11. Trabzon'un değişik bölgelerinden toplanan <i>Primula vulgaris</i> örneklerinin etanolik ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerleri (Ort±SP)	41
Tablo 12. RP-HPLC-UV ile numunelerin fenolik bileşen sonuçları	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. <i>Primula vulgaris</i> genel görünüşü	4
Şekil 2. Antioksidanların Sınıflandırılması	12
Şekil 3. Tokoferollerin genel yapıları	13
Şekil 4. β -karotenin yapısı	14
Şekil 5. Askorbik asidin yapısı (C vitamini)	14
Şekil 6. Bazı önemli fenolik asit bileşiklerinin kimyasal yapıları	16
Şekil 7. Rutin'in yapısı	18
Şekil 8. FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim	20
Şekil 9. DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) radikalın formülü	21
Şekil 10. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalının indirgenmesi	21
Şekil 11. HPLC cihazı akış şeması	23
Şekil 12. Döner buharlaştırma düzeneği	31
Şekil 13. Toplam polifenolik madde tayini için gallik asit standardı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği	35
Şekil 14. Trabzon bölgesi <i>Primula vulgaris</i> örneklerinin sulu ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması	36
Şekil 15. Trabzon bölgesi <i>Primula vulgaris</i> örneklerinin etanolik ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması	36
Şekil 16. FRAP testi için Troloks standardı kullanılarak elde edilen standart çalışma grafiği	37
Şekil 17. Trabzon bölgesi <i>Primula vulgaris</i> örneklerinin sulu ekstraktlarındaki FRAP antioksidan değerlerinin karşılaştırılması	38
Şekil 18. Trabzon bölgesi <i>Primula vulgaris</i> örneklerinin etanolik ekstraktlarındaki FRAP antioksidan değerlerinin karşılaştırılması	38
Şekil 19. Trabzon bölgesi <i>Primula vulgaris</i> örneklerinin sulu ekstraktlarındaki DPPH radikal temizleme aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması	39

Şekil 20. Trabzon bölgesi <i>Primula vulgaris</i> örneklerinin etanolik ekstraktlarındaki DPPH radikal temizleme aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması	40
Şekil 21. Bitkinin Yaprak-dal kısmının Sulu [ASM(y-d)s] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	41
Şekil 22. Bitkinin çiçek kısmının Sulu [ASM(ç)s] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	42
Şekil 23. Bitkinin yaprak-dal kısmının Sulu [MVS(y-d)s] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	42
Şekil 24. Bitkinin çiçek kısmının Sulu [MVS(ç)s] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	42
Şekil 25. Bitkinin yaprak-dal kısmının Sulu [TSB(y-d)s] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	43
Şekil 26. Bitkinin çiçek kısmının Sulu [TSB(ç)s] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	43
Şekil 27. Bitkinin Yaprak-dal kısmının Sulu [MVM(y-d)s] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	43
Şekil 28. Bitkinin çiçek kısmının Sulu [MVM(ç)s] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	44
Şekil 29. Bitkinin yaprak-dal kısmının Etanolik [ASM(y-d)e] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	44
Şekil 30. Bitkinin çiçek kısmının Etanolik [ASM(ç)e] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	44
Şekil 31. Bitkinin yaprak-dal kısmının Etanolik [MVS(y-d)e] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	45
Şekil 32. Bitkinin çiçek kısmının Etanolik [MVS(ç)e] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	45
Şekil 33. Bitkinin yaprak-dal kısmının Etanolik [TSB(y-d)e] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	45
Şekil 34. Bitkinin çiçek kısmının Etanolik [TSB(ç)e] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	46

Şekil 35. Bitkinin yaprak-dal kısmının Etanolik [MVM(y-d)e] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	46
Şekil 36. Bitkinin çiçek kısmının Etanolik [MVM(ç)e] ekstraktının DPPH-SC ₅₀ Grafiği	46
Şekil 37. HPLC-UV tarafından 280 nm'deki kromatogramı	49
Şekil 38. ASM(y-d)e kodlu numunenin kromatogramı	49
Şekil 39. ASM(ç)e kodlu numunenin kromatogramı	49
Şekil 40. MVS(y-d)e kodlu numunenin kromatogramı	50
Şekil 41. MVS(ç)e kodlu numunenin kromatogramı	50
Şekil 42. TSB(y-d)e kodlu numunenin kromatogramı	50
Şekil 43. TSB(ç)e kodlu numunenin kromatogramı	51
Şekil 44. MVM(y-d)e kodlu numunenin kromatogramı	51
Şekil 45. MVM(ç)e kodlu numunenin kromatogramı	51

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ASM(ç)	: Akçaabat bölgesi mor çiçekli <i>Primula vulgaris subsp. sibthorpii</i> çiçek kısmı
ASM(y-d)	: Akçaabat bölgesi mor çiçekli <i>Primula vulgaris subsp. sibthorpii</i> yaprakdal kısmı
BHA	: Bütilenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütilenmiş hidroksi toluen
°C	: Santigrat derece
CUPRAC	: Bakır (II) indirgeme/antioksidan kapasite
DAD	: Fotodiyot dizisi dedektörü
DHAA	: Dehidroaskorbik asit
dk	: Dakika
DPPH	: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
e⁻	: Elektron
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan kapasitesi
g	: Gram
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GPx	: Glutasyon peroksidaz
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KAT	: Katalaz
kDa	: Kilodalton
LC	: Likit kromatografisi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
m	: metre
mM	: Milimolar
M	: Molar
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre

MVM(ç)	: Maçka bölgesi mor çiçekli <i>Primula vulgaris subsp. vulgaris</i> çiçek kısmı
MVM(y-d)	: Maçka bölgesi mor çiçekli <i>Primula vulgaris subsp. vulgaris</i> yaprak-dal kısmı
MVS(ç)	: Maçka bölgesi sarı çiçekli <i>Primula vulgaris subsp. vulgaris</i> çiçek kısmı
MVS(y-d)	: Maçka bölgesi sarı çiçekli <i>Primula vulgaris subsp. vulgaris</i> yaprak-dal kısmı
nm	: Nanometre
ORAC	: Oksijen radikal antioksidan kapasitesi
pH	: Hidrojenin gücü
ppm	: Milyonda bir birim
RID	: Refraktif indeks dedektörü
HPLC	: Ters faz- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi- Ultra viyole
RT	: Alıkonma zamanı
SC₅₀	: % 50 Temizleme konsantrasyonu
SP	: Kalibrasyon eğrisinin en düşük seviyesindeki standart sapma
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TP	: Toplam polifenolik madde
TPTZ	: Tripridiltiazin
Troloks[®]	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
TSB(ç)	: Bostancı bölgesi beyaz çiçekli <i>Primula vulgaris subsp. sibthorpii</i> çiçek kısmı
TSB(y-d)	: Bostancı bölgesi beyaz çiçekli <i>Primula vulgaris subsp. sibthorpii</i> yaprak-dal kısmı
UV	: Ultraviyole
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

Simgeler

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: gama
δ	: Delta
%	: Yüzde

Formüller

$\text{CCl}_3^\bullet$	: Triklorometil radikali
CCl_4	: Karbon tetraklorür
Cl^-	: Klor iyonu
$\text{Fe}^{2,3+}$	: Demir iyonu
FeCl_3	: Demir(III) klorür
$\text{H}^\bullet$	: Hidrojen radikali
HCO_3^-	: Bikarbonat iyonu
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
$\text{HO}_2^\bullet$	: Perhidroksil radikali
NH_2	: Amin
$\text{NO}^\bullet$	: Azot monoksit
NO_2	: Azot dioksit
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
$\text{O}_2^{\bullet -}$	: Süperoksit radikali
$\text{OH}^\bullet$	: Hidroksil radikali
$\text{RO}^\bullet$	: Alkoksil radikali
$\text{ROO}^\bullet$	: Peroksil radikali
$\text{RS}^\bullet$	: Tiyl radikali

1. ÖZET

***Primula vulgaris* (Çuha Çiçeği) Ekstraktlarının HPLC ile Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi**

Yapılan çalışmada Trabzon Bostancı, Akçaabat ve Maçka yörelerinden 2013 yılı Haziran ayında toplanan *Primula vulgaris* subsp. *vulgaris* ve *Primula vulgaris* subsp. *sibthorpii* türlerinin biyolojik aktif bileşenlerinin yapısının aydınlatılması ve antioksidan özelliklerinin tespit edilmesi amaçlandı.

13 adet fenolik bileşeni ters faz–yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC-UV) ile analiz edildi. Akçaabat, Maçka ve Bostancı bölgesinden toplanan *Primula vulgaris* bitkisinin çiçek ve yaprak-dal kısımları olan 8 adet numunemizin hepsinde protokatekuik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, gallik asit, vanilik asit ve rutin değişen konsanstrasyonlarda tespit edildi. Şiringik asit, epikateşin ve luteolin ise hiçbir bitki örneğinde tespit edilemedi.

Sulu ve etanolik *Primula vulgaris* ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri, toplam fenolik madde, demir (III) indirgeme antioksidan kuvveti (FRAP) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi testleri kullanılarak tayin edildi. Toplam fenolik madde miktarları gallik asit standardına göre tayin edildi. FRAP değerleri Troloks eşdeğeri antioksidan güç (TEAP) ve DPPH radikali temizleme tayini sonuçları SC₅₀ olarak ifade edildi. Toplam polifenol testinde en yüksek değer TSB(ç)_e'de 20.893 mg GAE/g numune olarak tespit edilirken düşük değer MVS(y-d)_e'de 2.266 mg GAE/g numune olarak tespit edildi. En yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesi ve en düşük radikal temizleme aktivitesi, sırasıyla, Bostancı yöresine ait TSB(ç)_e'de 0.256 mg/mL ve Akçaabat yöresine ait ASM(y-d)_e'de 7.858 mg/mL olarak bulundu. En yüksek FRAP değeri MVS(ç)_e'de 223.11 µmol Troloks/g numune; en düşük değer ASM(y-d)_e'de 15.93 µmol Troloks/g numune olarak tespit edildi. Sonuç olarak *Primula vulgaris* ekstraktlarının hem çiçek hem de yaprak-dal kısımlarında değişik düzeylerde antioksidan aktivitelerinin varlığı tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Antioksidanlar, HPLC, Tıbbi bitkiler

2. SUMMARY

Characterization By HPLC of *Primula vulgaris* Extracts and Examination of Biological Activity

In this research, it is aimed to enlighten the biologic structure of the active components of *Primula vulgaris* subsp. *vulgaris* ve *Primula vulgaris* subsp. *sibthorpii* species, which were picked from Trabzon Bostancı, Akçaabat and Maçka regions in 2013, and to identify the antioxidant features of them.

13 phenolic component was analysed by reversed phase - high performance liquid chromatography (RP-HPLC). In all of the 8 samples from *Primula vulgaris* plant's flower and leaf-branch parts, protocatecuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, gallic acid, vanillic acid and routine was found variable concentrations. Syringic acid, epicatechin and luteolin couldn't be identified in these samples.

The antioxidant activities of aqueous and ethanolic extracts of *Primula vulgaris* was defined by using total phenolic material, iron (III) reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity tests. Total phenolic contents were determined according to the gallic acid standart. FRAP rates were explained as Trolox equivalent antioxidant power (TEAP) and DPPH radical scavenging assay results were explained as SC₅₀. In total polyphenol test, the highest rate was found as 20.893 mg GAE/ g sample in TSB(ç)e, on the other hand, the lowest rate was found as 2.266 mg GAE/ g sample in MVS(y-d)e. The highest DPPH radical scavenging activity were found to be TSB(ç)e in Bostancı area with 0.256 mg/mL and ASM(y-d)e in Akçaabat area with 7.858 mg/mL, respectively. The highest value of FRAP was found as 223,11 µmol Troloks/g sample in MVS(ç) and the lowest value was found as 15.93 µmol Troloks/g sample in ASM(y-d). In conclusion, in both flower and leaf-branch parts of *Primula vulgaris* extracts, existance of antioxidant activities in different levels were found.

Key Words: Antioxidants, HPLC, Medicinal plants

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Türkiye, bitki tür ve çeşitleri bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir. Dünyada var olduğu tahmin edilen bitki türlerinin sayısının yaklaşık olarak 250 000 ile 750 000 arasında değiştiği bilinmektedir (1). Tüm Avrupa Kıtası'nda yaklaşık 12 bin bitki türü yer alırken Türkiye'de 12 binden fazla bitki türü bulunmaktadır (2). Türkiye 174 familyaya ait 1251 cins ve 12 binden fazla tür ve tür altı taksonu ile oldukça zengin bir floraya sahiptir (3,4). Bu bitkilerin 1000'den fazlası ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır (5).

Modern tıbbın ve sentetik ilaçların bu denli gelişmiş olmasına rağmen, bugün dünya nüfusunun çoğunluğunda bitkisel amaçlı tedavi yolları oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu durum bize bitkilerin önemli ilaç kaynakları olduğunu göstermektedir. Sentetik ilaçların yerine bitkisel ilaçların kullanılmasının altında çeşitli sebepler yatmaktadır. Öncelikle bitkisel kaynaklara ulaşmak sentetik ilaçlara ulaşmaktan daha ucuz ve daha kolaydır. Bunun yanında halk arasında uzun zamandır tedavi amaçla kullanılan bitkilerin daha az yan etkilerinin olması ikinci tercih noktasıdır. Bir de bazı sentetik ilaçların her zaman bulunmaması hastalara sorun yaşatmaktadır. Ekonomik yönden yeterince gelişmemiş, kalkınmakta olan ülkelerdeki insanların bitkilerden yararlanmak, kolay ve ucuz bir tedavi imkanı elde etmek istemeleri diğer bir sebebi oluşturmaktadır.

Şifalı bitki olarak isimlendirilen bazı bitkilerin “kocakarı ilacı” olarak adlandırılıp, bilinçsizce kullanıldığı maalesef bilinen gerçeklerdendir. Şifalı bitkiler her ne kadar kökenini kocakarı ilaçlarından almış olsa bile toplumda yerlerini korumuş ve günümüze kadar gelebilmiştir. Ne yazık ki günlük yaşamımızda ayaklarımızın arasında dolaşan birçok bitkinin çeşitli rahatsızlıklara iyi geldiği bilinmemektedir. Sentetik ilaçların hammaddesini bitkiler oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, tıbbi amaçla kullanılan ilaçların birçoğunun bitkisel kaynaklı olması gerçeğinden yola çıkarak *Primula vulgaris* subsp. *vulgaris* ve *Primula vulgaris* subsp. *sibthorpii* bitkilerinin kimyasal bileşimini aydınlatmak, antioksidan özelliklerini ortaya çıkarmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Primula vulgaris* Hakkında Genel Bilgi

Primula L. cinsi, Primulaceae familyasının en büyük cinsi olup dünyada *Primula* cinsine ait türlerin süs bitkisi olarak yaygın şekilde kültürlü yapılmaktadır (6). *Primula* cinsi, dünyada 425 tür ile temsil edilmekte olup (7) bunların %75'i Himalaya dağlarında ve Batı Çin'de yayılış göstermektedir (8). *Primula* cinsi ülkemizde 3 alt cinste yer alan 8 tür ve bu türlere bağlı 11 takson ile temsil edilen bunlardan *P. davisii* W.W. Sm ve *P. longipes* Freyn & Sint. taksonları, ülkemizin önemli gen kaynakları içinde yer alan endemik bitkilerdir (9). *Primula* cinsinin bazı türleri halk ilacı olarak kullanılmaktadır (10). Özellikle *P. veris* L., *P. vulgaris* Huds. ve *P. elatior* (L.) Hill türlerinin yaprak ve rizomlarından elde edilen özütlerin diüretik, antispazmodik, ağrı kesici, ateş düşürücü, balgam sökücü, öksürük giderici, sakinleştirici, uykusuzluk hastalıklarını giderici olarak ve soğuk algınlığı, akut ve kronik bronşit hastalıklarının tedavisinde eski tarihlerden bu yana yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Şekil 1), (5, 10, 11).



Şekil 1. *Primula vulgaris* Genel Görünüşü

- Alem : Plantae (Bitkiler)
- Bölüm : Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
- Sınıf : Magnoliopsida (İki çenekliler)
- Takım : Ericales
- Familya: Primulaceae (Çuha çiçeğigiller)

Cins : *Primula*

Tür : *Primula vulgaris*

Alttür 1.: *Primula vulgaris subsp. vulgaris*

Alttür 2.: *Primula vulgaris subsp. sibthorpii*

***Primula vulgaris subsp. vulgaris*:** Çiçekleri açık sarı veya beyaz renklidir. Türkiye'deki bitkiler 500-2100 m arasındaki yükseltilerde bulunurlar. Avrupa-Sibirya elementidir. Çiçeklenmeleri Mart ve Haziran ayları arasında gerçekleşir. Genellikle gölgeli veya açık çayırılık alanlar, yaprağını döken veya her dem yeşil ağaçların altı ve çayırılıklar gibi nemli alanlarda yayılış gösterirler.

***Primula vulgaris subsp. sibthorpii*:** Çiçekleri mor-pembe ile leylak rengi bazen beyazdır. Türkiye'deki bitkiler 1-850 m arasındaki yükseltilerde yayılış gösterirler. Çiçeklenmeleri Mart ve Mayıs ayları arasında gerçekleşir. Maki, meşe ormanları, fındık bahçeleri, çayırlar, çalılıklar ve çimenlik alanlarda ve sıklıkla nemli bölgelerde bulunur. Türkiye'nin batı bölgelerinde *Primula vulgaris subsp. sibthorpii* düşük yükseltilerde bulunur (12).

4.2. Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanılması

Dünya var olduğundan beridir hastalık etkenlerinin dünya üzerinde mevcut olduğu, dolayısıyla ilk insanların dahi hastalıklara karşı bir korunma yöntemine sahip olduğu düşünülmektedir. İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır (13).

Yüzyıllardan beri süregelen insan ve bitki arasındaki bağ sonucunda günümüzde tüm dünyanın kabul ettiği ve önemli araştırmaların yapıldığı etnobotanik bilim dalı doğmuştur (13).

'Tıbbi bitkilerle tedavi' anlamına gelen 'fitoterapi' terimi ilk kez Fransız hekim Henry Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılıp tıp literatürüne kazandırılmıştır. Günümüzde eczanelerde satılan ilaçların birçoğu bitkisel kaynaklı ya da bitkisel kaynaklı bileşiklerin sentezlenmiş türevidir. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, insanları tekrar bitkisel kaynaklı ilaçları kullanmaya yönlendirmiştir. Bu amaçla yeni bitkisel ilaç hammaddeleri bulmak üzere bitkiler

üzerine yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Romanya, Macaristan, in, Kore, Japonya ve Bulgaristan gibi birçok ülkede bitkilerle tedavi bir devlet politikası halinde yürütülmektedir (10,14,15,16,17).

4.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Oksijen insan yaşamı için çok gerekli olmakla birlikte metabolik yolların birincil oksidan molekülüdür. Oksidatif stres oksijen kullanan metabolik yollardan kaynaklanmakta olup oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur. Oksidatif stres; kanser, kalp hastalıkları, yaşlanma, diyabet ve diyabetin komplikasyonları gibi pek çok patolojik tablonun patogenezi ile yakın ilişkidedir. Oksidatif stres karbohidratlar, proteinler, nükleik asitler ve lipidler gibi birçok biyomolekle zarar vermektedir. Karbohidratlar oksidatif stres ürünleri olan serbest radikallerle reaksiyona girerek karbon merkezli radikallere dönüşmektedirler. Hidroksil radikali nükleik asitlerin yapısındaki pentoz fosfat yapıya saldırarak çeşitli değişikliklere neden olmaktadır. Son yıllarda nükleik asit yapısındaki 8-hidroksi guanozin ölçümü oksidatif hasar göstergesi olarak kullanılmaktadır. Proteinlerin yapısındaki triptofan, tirozin, metiyonin, prolin, histidin, fenil alanin amino asitleri değişikliğe uğrayarak oksidatif stresten etkilenmektedirler. Lipidler oksidatif stres neticesinde peroksidasyona maruz kalarak membranların yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler meydana getirir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid, membran komponentlerinin çapraz bağlanması ve polimerizasyonuna sebep olduğu için oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılmaktadır.

Serbest radikal; birçok fizyolojik veya patolojik yöntemlerle üretilen bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan herhangi bir atom veya moleküldür. Bir bileşik bir elektron kaybederek veya ilave bir elektron alarak serbest radikal oluşturabilir. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü veya nötral olabilirler. Radikaller daha büyük bir yapının parçası olabilir veya küçük ve serbestçe difüze olabilen türler halinde olabilir (18).

Bugün radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücresel hasar ve doku yıkımında rol oynadığı kabul edilmektedir (19). Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Serbest radikallerin

sigara, alkol ve lipid metabolizması ürünleri, virüsler, güneş ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve havanın etkisiyle de oluşabildiği bilinmektedir (20). Ayrıca serbest radikaller aktive olmuş fagositler, nitro furantoin, bleomisin, doksorubusin, adriamisin gibi antineoplastikler ve stres sonucu biyolojik olarak üretilir. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeni ile çok reaktif olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir ve yararlı biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olmaktadır. Günümüzde serbest radikaller kanser, yaşlanma, alzheimer, ateroskleroz gibi çeşitli hastalıkların oluşmasından sorumlu ajanlar olarak bahsedilmektedir.

Radikaller, serbest oksijen radikalleri ve oksijen içermeyen radikaller olarak ikiye ayrılır (21). İçerdiği iki eşleşmemiş elektrondan dolayı moleküler oksijenin kendisi diğer radikallerle kolayca reaksiyon verebilme yeteneğine sahiptir. Moleküler oksijen organizmalar için indirgenmiş karbon bileşiklerinin oksidasyonunda enerji oluşturmak üzere kullanılan en son elektron alıcısı olup suya indirgenebilmesi için dört elektrona ihtiyacı vardır. Biyolojik sistemlerde sık karşılaşılabilen serbest oksijen radikalleri Tablo 1’de verilmektedir.

Tablo 1. En Sık Karşılaşılan Serbest Radikaller ve Özellikleri

Serbest Radikalin ve Radikal Üreten Türün		
Adı	Simgesi	Kimliği
Hidrojen radikali	H [•]	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	O ₂ ^{•-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	OH [•]	En toksik oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	¹ O ₂	Yarılma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksil radikali	HO ₂ [•]	Lipidlerde hızla çözünerek lipid peroksidasyonunu artırmaktadır.
Peroksil radikali	ROO [•]	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipitlere lokalize olma yeteneğine sahiptir.
Triklorometil radikali	CCl ₃ [•]	CCl ₄ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	RS [•]	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil radikali	RO [•]	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	NO [•]	L-argininden <i>in vivo</i> üretilir.
Azot dioksit	NO ₂	NO [•] ’in oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

Serbest oksijen radikalleri biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin çoğunluğunu oluşturur. Bu radikallerin büyük kısmı aerobik solunum sırasında mitokondrilerde indirgenmiş karbon birimlerinden alınan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılardan geçerek moleküler oksijene transferi esnasında meydana gelir. Oksijenin tam olarak indirgenmesi sonucu su, kısmi indirgenmesi sonucu ise serbest oksijen radikalleri oluşur. Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), iki elektron almasıyla hidrojen peroksit (H_2O_2), üç elektron almasıyla ise hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikali meydana gelir (22, 23).

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir ve genellikle $O_2^{\bullet-}$ veya O_2^- anyonu şeklinde gösterilir. Süperoksit radikali aerobik hücrelerde ve daha çok elektron transfer sistemlerinde meydana gelir. Ayrıca bir çok enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir (24). Süperoksit radikali diğer radikallere göre daha az toksik etkiye sahiptir. Süperoksit radikali, yüklü olduğu için hücre membranından doğrudan geçemezken eritrosit membranlarındaki anyon kanalından Cl^- ve HCO_3^- iyonlarının yer değiştirmesiyle geçebilir. Süperoksit radikalının zararlı etkisi onun protonlanması ile çok daha aktif bir radikal olan perhidroksil radikalının ($HO_2^{\bullet}$) meydana gelmesiyle ortaya çıkar. Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girdiklerinde biri yükseltgenirken diğeri indirgenerek reaksiyon sonucunda oksijen molekülü ve hidrojen peroksit meydana gelir. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni meydana getirir. Reaksiyon sonunda radikal olmayan ürünler oluştuğundan bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (25).

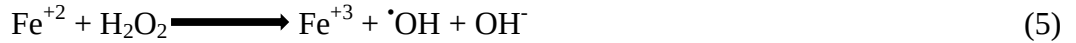


Hidrojen peroksit radikal olmamasına rağmen çeşitli radikallerin oluşumunda rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici hidroksil radikalini oluşturur (4).

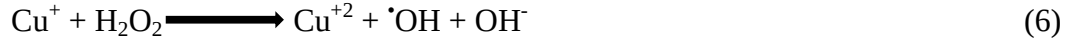


Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), serbest oksijen radikalleri türlerinin en reaktif olarak bilinen ve hücrelerde mevcut olan tüm organik yapılara saldırabilme yeteneğine sahip oksidandır. Hidroksil radikali hem iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle hem de hidrojen peroksitin bir elektron alarak indirgenmesiyle de oluşabilir.

H_2O_2 'deki O-O bağının ısıyla ya da iyonize edici reaksiyonla (ışıkla) homolitik olarak parçalanması iki hidroksil radikali verir. H_2O_2 ve Fe (II) tuzunun karışımı sonucunda hidroksil radikali oluşur (5).



Bakır (I) tuzları, Fe (II) tuzlarına göre daha hızlı bir şekilde H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur (6).



Hidroksil radikali oldukça reaktiftir ve yarılanma ömrü çok kısadır. Canlı sistemlerde oluşur oluşmaz en yakınındaki biyolojik molekül ile reaksiyona girer. Proteinlerdeki sülfidril grupları (7) ve yağ asitleri (8) hidroksil radikalının etkisinde kaldıklarında çeşitli etkilere sahip yeni radikalleri oluştururlar.



Serbest radikaller ve reaktif bileşikler oksidan veya prooksidan statüsünde değerlendirilir. Oldukça aktif moleküller olan serbest radikallerin çoğalması canlı sistemlerde kontrol edilemeyen hasarlara yol açabilirler. Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri etkisiz hale getirerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik bileşik taşıyan moleküllerdir (26).

Prooksidanlar (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olay ve hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır (27). Çünkü antioksidanlar, prooksidanları etkin bir şekilde indirgeyerek az zararlı veya zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler.

Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı-aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (28).

Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile bazı kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (29).

Antioksidanlar dört farklı şekilde etki ederler. Bu mekanizmalar:

1. Toplayıcı etki
2. Bastırıcı etki
3. Onarıcı etki
4. Zincir kırıcı etki

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu şekilde etki gösterirler.

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bu tip bir etki gösterirler.

Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki adı verilir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etkiye sahiptirler. Zincir kırıcı antioksidan aktivitenin değerlendirilmesinde antioksidanın hem molekül başına verebildiği elektron ya da giderebildiği serbest radikal sayısı, hem de reaksiyon hızı önemlidir (30).

Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Bu bileşikler oksidatif sistemde farklı şekillerde davranabilirler. Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri tutma özelliğini kullanarak zincir reaksiyonlarının başlamasını önlerler, metal iyon katalizörlerini bağlarlar (31). Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler

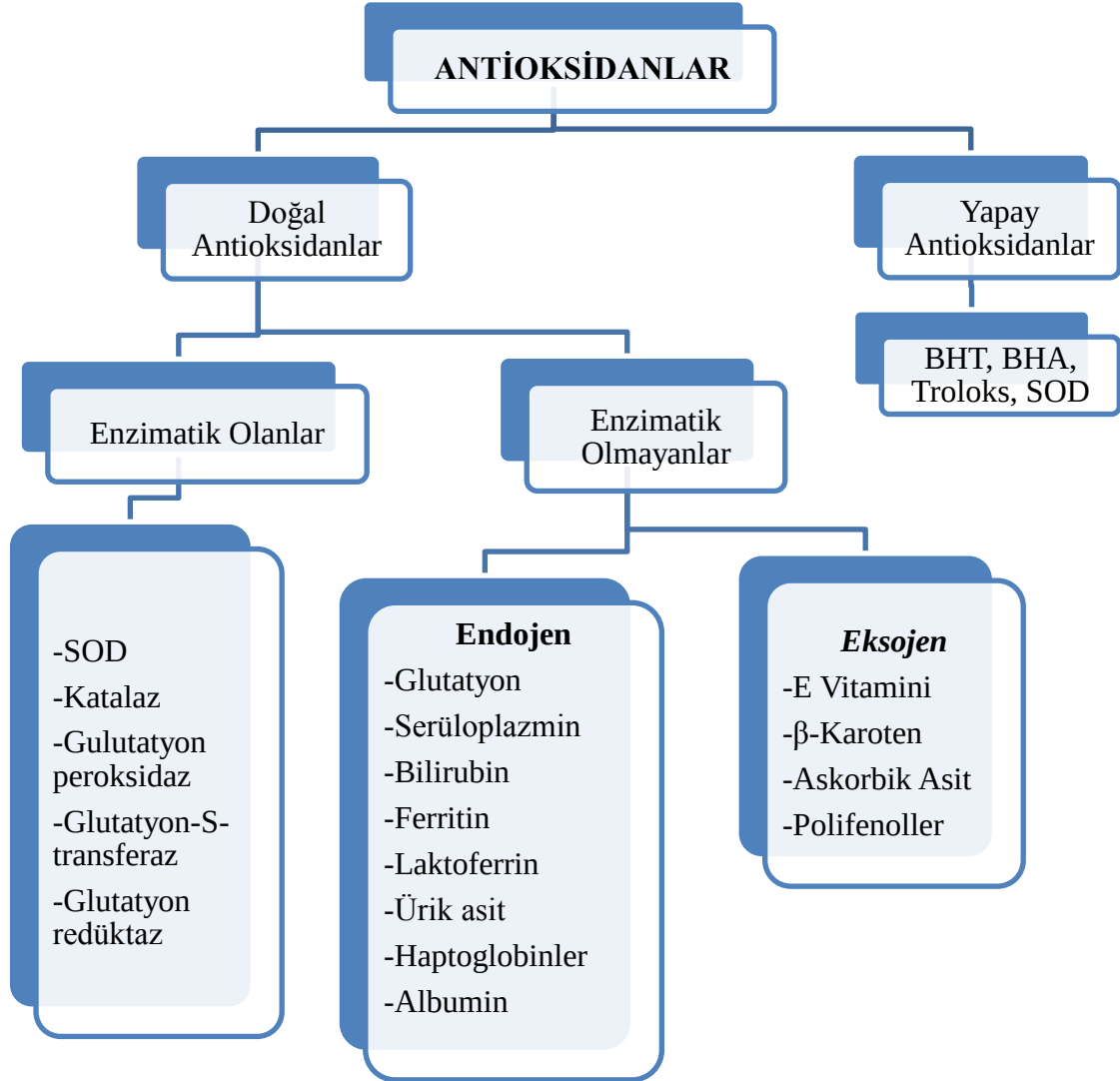
olduğundan zincir reaksiyonlarını (örneğin lipidlerin oksidatif parçalanmasına yol açan radikalik zincir reaksiyonunu) koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yükseltgenebilen maddeyi (örneğin biyolojik makromolekülleri) yalnız sınırlı bir zaman için koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder. Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle, hidrojen veya elektron donör araçları olarak indirgeme potansiyelleri genellikle onların serbest radikal tutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir (29).

Antioksidanlar doğal ve yapay antioksidanlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır. Doğal antioksidanlar etki mekanizmalarına göre enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olarak iki sınıfa ayrılır. Şekil 2’de antioksidanların sınıflandırılması gösterilmiştir.

Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim olan süperoksit dismutaz (SOD), oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerinden korur, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Glutatyon peroksidaz (GPx), hücre içinde düşük konsantrasyonda oluşan peroksit ürünlerinin (R_2O_2) dismutasyonundan ve katalaz (KAT) ise yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin (H_2O_2) dismutasyonundan sorumlu enzimatik antioksidanlardır (23,24). Dört hem grubundan oluşan katalaz, aerobik solunum veya başka yollarla oluşan hidrojen peroksiti oksijen ve suya dönüştürerek zararlı etkisinden organizmayı korur. Katalaz, 60 kDa molekül ağırlığına sahip olup hidrojen peroksit, metil etil hidroperoksitleri gibi küçük molekül ağırlıklı molekülleri etkilerken büyük molekül ağırlığına sahip lipit hidroperoksitleri etkilemez (23).

Karaciğerde, genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptit olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu, amino asitlerin membrandan transportu, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini engelleme gibi görevleri olan enzimatik olmayan antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı olan bilirubin, ürik asit, albümin, bakır iyonlarını bağlayarak metal

katalizli reaksiyonları sınırlayan seruloplazmin, hemoglobin ve ferritin endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlardır (32,21).



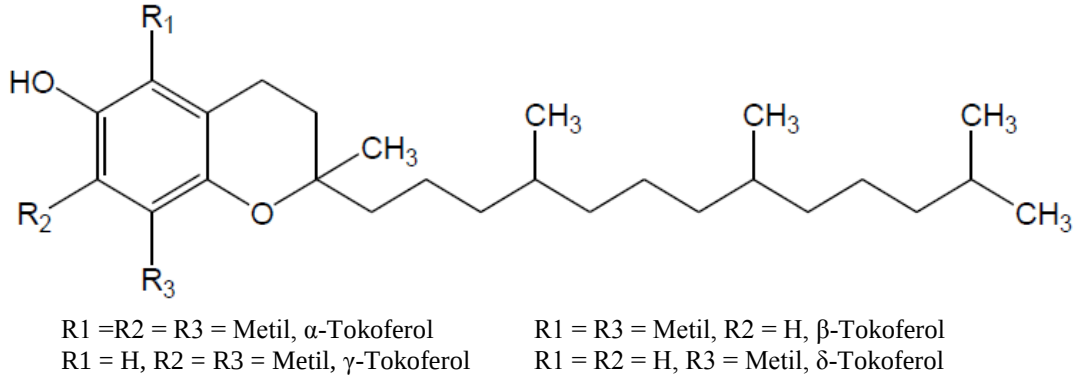
Şekil 2. Antioksidanların Sınıflandırılması

4.3.1. Doğal Antioksidanlar

4.3.1.1. E Vitamini

Yağda çözünebilir antioksidanların en yaygını olan E vitamini, başta hücre membranları olmak üzere hücrenin lipid kısımlarını korumaktadır (28). Tokoferoller ve tokotrienoller olmak üzere iki gruba ayrılırlar ve her iki grup için dört izomer (α -, β -, γ - ve δ -) vardır. Hemen hemen tüm gıdalarda az miktarda dahi olsa bulunurlar. Bu gruptaki en önemli antioksidan E vitamininin en aktif formu olan α -tokoferoldür (33).

Tokoferoller, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline vererek antioksidatif aktivite göstermektedirler. Tokoferoller ısıya karşı oldukça dayanıklıdır. α -Tokoferolün oksidatif kararlılığı artırmada ve sıcaklık arttıkça oksidasyon hızını azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir (34). Tokoferollerin genel yapıları şekil 3’de gösterilmiştir.

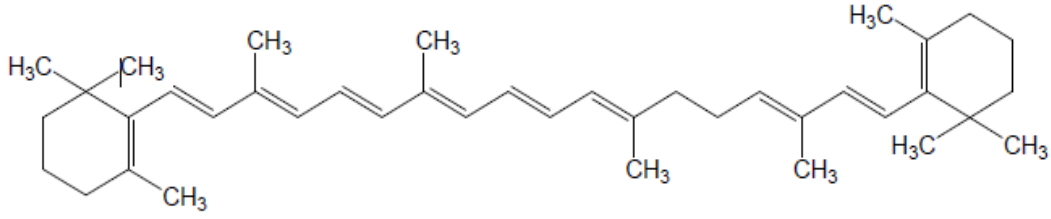


Şekil 3. Tokoferollerin Genel Yapıları

Tokoferoller lipofilik antioksidan oldukları için LDL gibi plazma proteinlerinde birikme eğilimindedir. Bu grup antioksidanların bir radikal zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan lipid peroksil radikallerini yakalamada çok etkili oldukları bildirilmektedir (35). Vücut membranlarında bulunan E vitamini içeriği; mikrozomal membranları, LDL’yi ve diğer organları hidroksi, peroksi, alkoksi radikalleri, tekli oksijen ve oksijen-metal kompleksleri gibi peroksidasyon bileşiklerine karşı koruyucu etki göstermektedir. Bu bileşikler sadece lipidlere zarar vermekle kalmayıp, aynı zamanda lipid hidroperoksitleri gibi alkoksi ve organik peroksi radikallerine parçalanabilen ve lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarına neden olabilen ikincil ara ürünler üretmektedir. Tokoferoller bu radikalleri yakalayarak zincirin ilerleme basamağını durdurmaktadırlar (36).

4.3.1.2. Karotenoidler

Karotenoidlerden en iyi bilineni A-provitamini olarak da tanınan β -karoten’dir ve yapısı şekil 4’de gösterilmiştir. A vitamini tek başına antioksidan özellik göstermez fakat β -karoten kendiliğinden antioksidan aktivite gösterir (37).

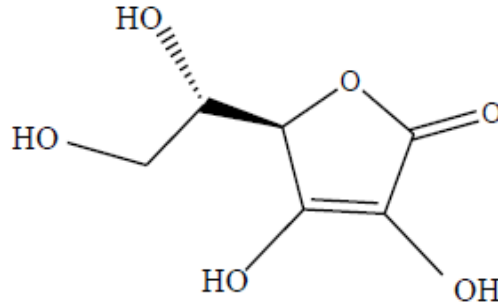


Şekil 4. β -karotenin Yapısı

A vitamini, ön maddesi olmadan vücut tarafından sentezlenemediğinden insanlar ve tüm memeli hayvanlar için dışarıdan alınması zorunlu bir vitamindir.

4.3.1.3. C Vitamini (Askorbik asit)

Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C-vitamini (Şekil 5), diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilir ve serbest radikalleri doğrudan söndürebilen güçlü bir antioksidan kaynağıdır (38). C vitaminleri insan vücudunda sentezlenmez, idrarla atıldığından vücutta depolanmaz dolayısıyla her gün dışarıdan alınması gereken vitaminlerdendir.



Şekil 5. Askorbik Asidin Yapısı (C vitamini)

Askorbik asidin antioksidan olarak rolü çok yönlü olup, bu vitamin lipid oksidasyonunu farklı mekanizmalarla önlemektedir:

- Serbest radikal ve oksijen yok edici olarak indirgen etkileriyle bazı okside olabilir bileşikler korumaktadır.
- Daha az reaktif olan semidehidroaskorbat ve dehidroaskorbik asit (DHAA) radikale dönüşmek suretiyle oksijen ve karbon merkezli radikalleri indirgemektedir.
- Bazı antioksidanları rejenere etmektedir (39).

Nitrik oksit ile süperoksidin reaksiyon ürünü olan peroksinitrit çok kısa yarı ömürlü reaktif bir moleküldür. Peroksinitritin zararlı etkilerinin engellenmesinde birçok antioksidan bileşik mevcuttur (40, 41). Peroksinitriti temizleme aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda flavanoidler, kateşinler, hidroksiguanidinler, metalotiyonein, indirgenmiş nikotinamid nükleotidleri ve ürik asit bileşikleri kullanılmıştır. Bazı bileşikler peroksinitriti ortadan kaldırırken bazıları ise peroksinitritin gerçekleştirdiği değişikliklerin geri dönüşümünü sağlamaktadır.

Troloks, rutin, bütillenmiş hidroksi tolueen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), sentetik olarak üretilen ve antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılan antioksidanlardır.

4.4. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler

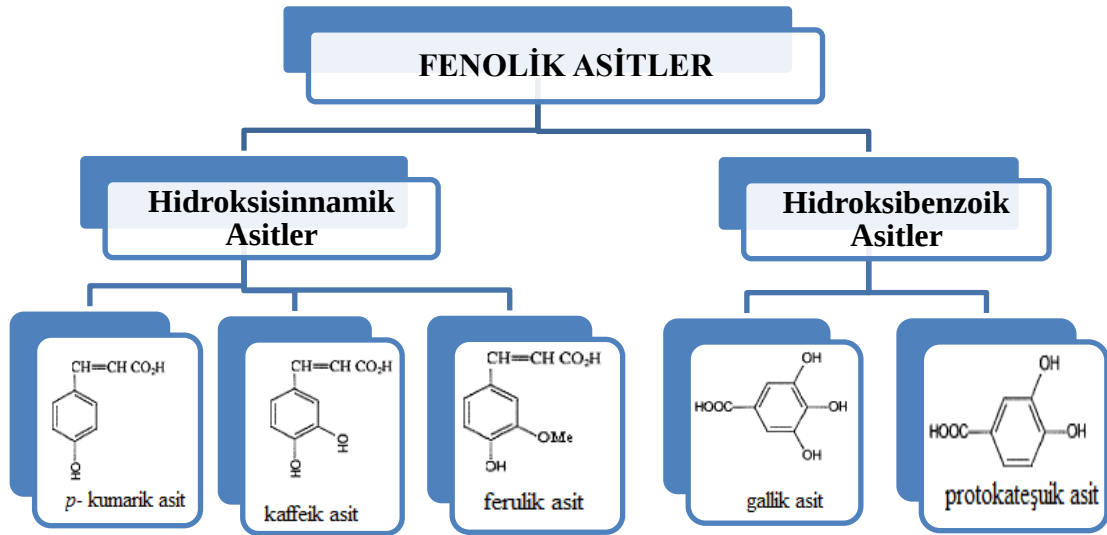
Dünya var olduğundan beridir doğal bileşiklere verilen önem her geçen gün artmaktadır. Doğal bileşiklerin bir kısmı bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküllerdir. Fitokimyasallar olarak adlandırılan bu moleküller mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bitkiler sınırsız sayıda aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahiptirler ve bu bileşiklerin çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitüye olmuş halleridir.

4.4.1. Fenolik Bileşikler

Bütün bitkiler metabolizmalarında, ikincil metabolizma ürünleri olarak, ancak bitkinin kendi metabolizmalarındaki rolleri yeterince bilinmeyen, doğal olarak sentezlenen fenolik madde oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, bitkisel kökenli bütün gıdalarda kendine özgü tadını ve rengini veren daima farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır.

Fenoller, oksijenli aromatik bileşiklerden olup, bir veya daha fazla hidroksil (OH) grubu taşıyan en az bir aromatik halkaya sahip organik maddelerdir. Suda orta derecede olmak üzere alkol, eter gibi organik çözücülerde iyi çözünürler. Polifenoller; flavonoidlerin çıkış maddesi olarak bitkiler aleminin büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Bitkilerde en yaygın bulunan polifenolik bileşikler basit fenoller,

benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetil asitler, hidrosinamik asitler, fenilpropenler, kumarinler, naftakinonlar, kromoneler, ksantonlar, stilbenler, antrakionlar, flavonoidler ve ligninlerdir. Fenolik bileşikler basit fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki ana başlıkta incelenmektedir. Fenolik asitler, iki fenolik bileşik olan benzoik asit (1) ve sinamik asit (2) ten türeyen bileşikler olarak karşımıza çıkarlar. Fenolik asitler genellikle bitkinin taç kısmında bulunur ve antioksidan özellik gösterirler. Bitkilerde organik asit esterleri veya glikozitleri olarak yaygın şekilde bulunan başlıca fenolik asitler; gallik asit, p-hidroksisinnamik asit, trans-sinamikasid 3,4-dehidroksibenzoik asit, vanillik asit, syringicacid, p-kumarik asit, o- kumarik asit, kaffeik asit, ferulik asit, klorogenik asit, rosmarinik asit, absisik asittir. Bazı önemli fenolik asit bileşikleri Şekil 6’de gösterilmiştir.



Şekil 6. Bazı Önemli Fenolik Asit Bileşiklerinin Kimyasal Yapısı

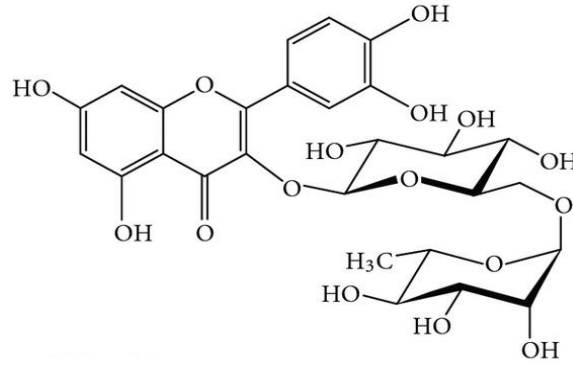
İster fenolik asitlerde ve isterse de flavonoller veya flavonoidlerde olsun bileşenlerin pozisyonu ve hidroksilasyon dereceleri antioksidan aktiviteyi belirlemede önem taşımaktadırlar (42).

İnsan beslenmesinde meyve ve sebze tüketimi ile kanser arasında negatif bir ilişki olduğu yapılan bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur. Özellikle Akdeniz tipi beslenme tipinde bol meyve ve sebze tüketiminin kanserden kalp hastalıklarına kadar pek çok hastalığın yaygınlığının azaldığı dikkati çekmektedir (43). Sebebini meyve ve sebzelerin kalori değerlerinin karbonhidrat ve yağlara göre düşük olması ve içerdiği

fenolik asitler, flavanoidler, antosiyaninler, karotenoidler gibi fitokimyasal bileşenin biyolojik olarak aktif moleküller olması şeklinde açıklayabiliriz. Bitkiler sınırsız sayıda aromatik ve alifatik bileşik sentezleme yeteneğine sahiptirler. Fenolik asitler, flavonoidler, taninler, kumarinler, ligninler, kinonlar, stilbenler, kurkuminoidler ve antosiyaninler bitkilerin her türlü zararlı etki ve oksidatif strese karşı korunmasından sorumlu olan bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin çoğunluğunun potansiyel olarak antioksidan, antikarsinogenik, antimutagenik, antibakterial, antiviral ve antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (44,45,46,47,48). Flavonoidler ve fenolik asitler majör fenolik bileşikler olup onların sulu ve lipolitik ortamlardaki yapıları ile antioksidan ilişkileri üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (49,50,51). Genel olarak antioksidan aktivite hidroksil gruplarının sayısına ve pozisyonuna; bileşen ve flavonoid moleküllerin glikolizasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Flavonoid yapıdaki bazı hidroksil gruplarının varlığı antioksidan aktiviteyi artırmaktadır. Kuersetin dietlerde en bol bulunan flavonol olup potansiyel bir antioksidandır (52,53). Flavonoidler insan vücudu tarafından üretilemedikleri için günlük alınan besinlerden sağlanmalıdırlar.

Flavonoidler düzlemsel moleküllerdir. Flavonoid aglikonlar C-4'de bir karbonil ve C-3'de bir hidroksil grubunun varlığı, C-2 ve C-3 arasında doymuş bir tekli bağ ve C-3'de hidroksil grubu ve C-4'de karbonil grubunun olmadığı durumlarda yapı flavon, flavonol, flavanon ve flavanol tipleri içinde alt gruplara ayrılırlar.

Flavonoidler, genellikle suda çözünürlüklerini artıran ve inaktif formda depolanmalarına izin veren glikozit formunda bulunurlar (54). O- ve C- olarak 2 glikozidik bağ tipi vardır. C- glikozilasyon bölgesi aglikonun C-6 veya C-8 pozisyonuyla sınırlıdır. O- glikozilasyon bölgesi genelde aglikonun fenolik hidroksil grubunda bulunur (Şekil 7) (55).



Şekil 7. Rutin'in Yapısı

4.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Serbest radikal oluşumunu engelleyici veya mevcut olan serbest radikalleri etkisiz hale getirici özelliğe sahip her türlü bileşik antioksidan olarak adlandırılır. Bitkisel veya doğal kaynakların antioksidan özellikleri üretmiş oldukları sekonder metabolit ajanlardan ileri geldiğinden bu ajanların yapılarını aydınlatmak çoğu zaman mümkün olamamaktadır. İnce tabaka, kolon, gaz ve likid kromatografi yöntemleri gibi analitik ayırma yöntemleri bilimsel araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Doğal ürünlerin antioksidan aktiviteleri onların içerdikleri fenolik bileşiklerin miktarına ve cinsine bağlı olarak değişim gösterirler. Bu bileşikler oluşan bir radikali temizleyici (scavenging), hidrojen verici, singlet oksijen yakalayıcı, metal iyonu şelatlayıcı gibi farklı mekanizmalar üzerinden aktivite gösterirler (56,57).

Antioksidan maddeler etkinliklerini çoğu zaman redoks reaksiyonları üzerinden gerçekleştirirler. Antioksidan kapasitenin ölçülmesinde hidrojen atomu transferi ve elektron transferine dayanan yöntemler sıklıkla kullanılırlar (Huang vd., 2005)(58). Oksijen radikal/antioksidan kapasite testi (ORAC) (58), bakır (II) indirgeme/antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC) (59), LDL- oksidasyonunun inhibisyonu gibi yöntemler hidrojen atomu transferine dayanan metodlardır. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesine dayanan Folin yöntemi (60), Troloks eşdeğeri antioksidan yöntemi (TEAC) (61), demir (III) indirgeme/antioksidan yöntemi (FRAP) (62), β -karoten-linoleik asit yöntemi (63) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (64) radikali temizleme yöntemleri elektron transferine dayanan metotlardır.

Doğal ekstraktların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde en az üç farklı numune konsantrasyonunda çalışılarak bulunan sonuçlar standart bir antioksidan (Troloks, BHT, kateşin, gallik asit gibi) eşdeğeri cinsinden hesaplanır.

4.5.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TP)

Doğal ürünlerde bulunan ve sekonder metabolit olarak üretilmiş olan polifenoller, antioksidan kapasiteden sorumlu ajanlardır. Total olarak belirlenmeleri bulundukları kaynağın antioksidan özelliği hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. Ayrıca doğal ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında sayısı ya da yerleşimi açısından fikir vermesi bakımından önem taşır.

Folin Ciocalteu reaktifi ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanan Folin (65,58) metodu toplam fenolik madde ölçümü için yaygın olarak kullanılan bir metoddur. Yöntem sulu ortamda fenolik yapıya sahip bileşiklerin Folin reaktifiyle ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$) (Fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisi) alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan mor menekşe renkli kompleksin 765 nm’de maksimum absorbanşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

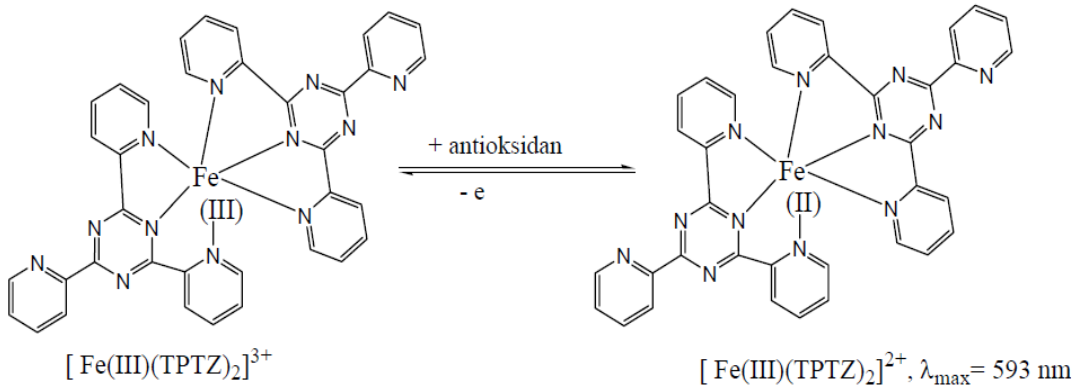
Fenolik bileşikler Folin Ciocalteu reaktifi ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verdiklerinden reaksiyon ortamını bazikleştirmek için sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek pH~10’a ayarlanır. Folin Ciocalteu yöntemi basit, duyarlı ve kesinliği yüksek bir metod olup en önemli dezavantajı ortamda bulunan ekstrakte edilebilir proteinleri de ekstrakte etmesidir. Ayrıca bu metodun diğer bir dezavantajı da analiz sırasında ortamda bulunan askorbik asit gibi indirgen maddelerle etkileşimde bulunmasıdır (58,65-67).

4.5.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kapasite Testi (FRAP)

FRAP yöntemi doğal ürünlerin ve ekstraktların toplam antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde en sık kullanılan yöntemlerden birisidir. Özellikle tiyol ve proteinlerin antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde sık kullanılır. Bu metod ilk olarak Oyaizu (1986) tarafından geliştirilmiş ve sonra Benzie ve Strain (1999) tarafından modifiye edilmiştir. FRAP metodu toplam antioksidan aktivite belirlemede kullanılan diğer metodlara göre basit, hızlı ve ucuzdur (67). FRAP yönteminin dezavantajı, antioksidan

aktivite gösteren glutasyonlar gibi bazı antioksidanlarla çok yavaş tepkimeye girmesidir. Ancak glutasyonlar, 593 nm dalga boyunda çok iyi absorbe edilemedikleri için bu dezavantaj ortadan kalkmaktadır. Özellikle meyve ve sebzelerde antioksidan aktivite tayininde FRAP metodu uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir (68).

FRAP metodu, FRAP reaktifi (2,4,6-tripiridiltriazin) (TPTZ)'nin düşük pH'larda oluşan Fe(III)-tripiridiltriazin kompleksinin (Fe(III)-TPTZ) elektron veren antioksidanların varlığında renkli (Fe(II)-TPTZ) formuna indirgenmesi esasına dayanır (Şekil 8). Meydana gelen (Fe(II)-TPTZ) kompleksinin mavi rengi 595 nm'de maksimum absorbans vermektedir, spektrofotometrede okunarak sonuçlar Troloks değeri cinsinden ifade edilir (69).

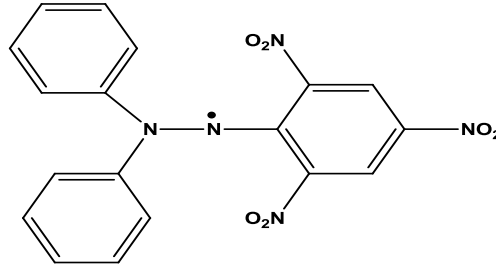


Şekil 8. FRAP Reaktifi ile Antioksidan Bileşik Arasındaki Etkileşim

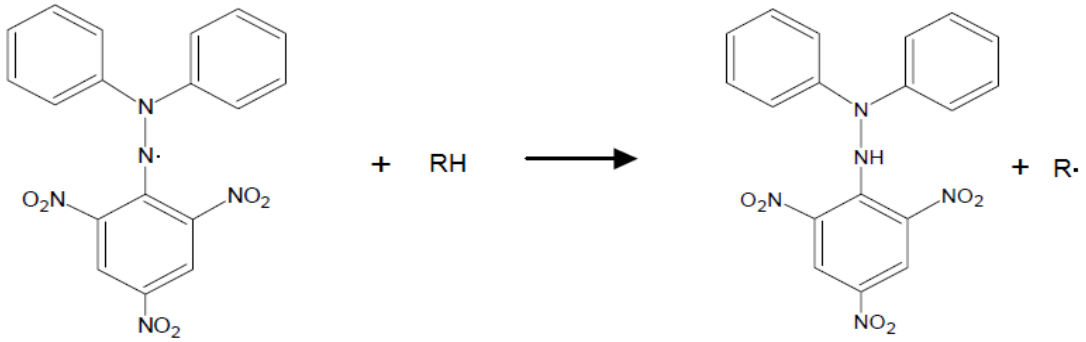
4.5.3. DPPH[•] (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) Radikali Temizleme Aktivitesi

Yöntemin ucuz, basit ve kısa sürede sonuç vermesi bakımından serbest radikal temizleme aktivitesi tayinlerinde çok yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. DPPH[•] radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup koyu menekşe renklidir. Bu radikal 517 nm dalga boyunda maksimum absorbans oluşturmaktadır. DPPH radikali antioksidan madde varlığında 517 nm'de maksimum absorbansındaki azalış ile tespit edilen bir yöntemdir (64). DPPH[•], farklı konsantrasyonlardaki örneklerle muamele edilerek absorbansındaki değişim ölçülür. Absorbanslara karşılık gelen konsantrasyon grafikleri çizilerek $y = ax + b$ denkleminde DPPH[•] konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı $\mu\text{g/mL}$, mg/mL cinsinden belirlenerek SC_{50} değeri olarak ifade edilmektedir. Şekil 9'de DPPH radikalinin

formülü, şekil 10’de bir antioksidan varlığında DPPH radikalinin indirgenme reaksiyonu gösterilmektedir.



Şekil 9. DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) Radikalin Formülü



Şekil 10. Bir Antioksidan Tarafından DPPH Radikalinin İndirgenmesi

Büyük antioksidan moleküllerin sterik engellemeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleri bu metodun dezavantajını oluşturmaktadır.

4.6. Bitki Bileşenlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler

4.6.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi diğer yöntemlerle kolaylıkla ayrılamayan karmaşık karışımlardaki benzer bileşenlerinin ayrılmasına izin veren metodlar grubudur. Kromatografik ayırmaların hepsinde numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülerek uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Numunedeki bileşenler hareketli ve sabit faz arasında kendiliklerinden farklı derecede dağılırlar. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla oldukça yavaş, sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler ise hızlıca hareket ederler. Numunedeki

bileşenlerin farklı hareket etmesi sonucu kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen farklı bantlar ortaya çıkar (70).

Kromatografi hareketli fazın özelliklerine bağlı olarak başlıca üç grup altında incelenebilir:

- Gaz kromatografisi
- Sıvı kromatografisi
- Süperkritik akışkan kromatografisi

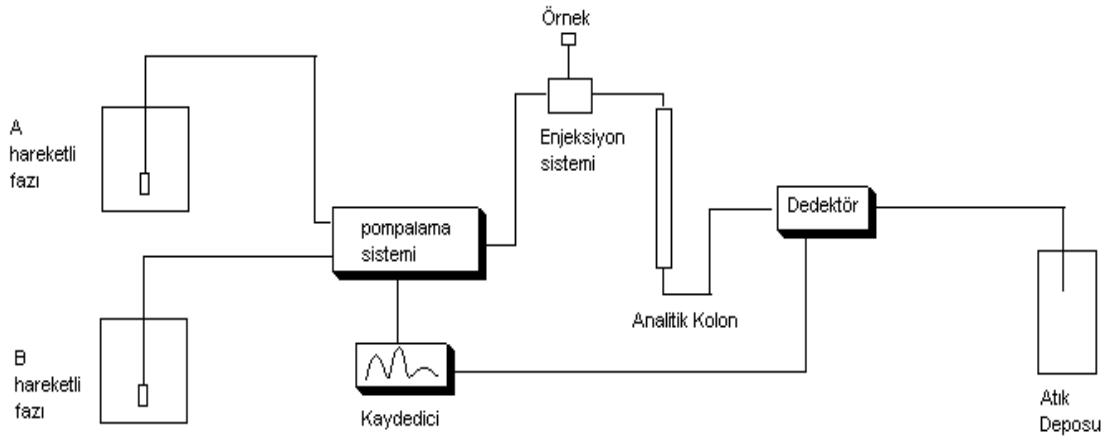
Kromatografik işlemler özelliklerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler:

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Dağılma (paylaşım) kromatografisi
- İyon-değişim kromatografisi
- Boyut eleme kromatografisi

4.6.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel örneklerindeki numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin ayrılması ve belirlenmesi için uygulanan kromatografik bir tekniktir (71). Ayrımı gerçekleştirilecek olan bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde farklı hızlarda ilerler. Kolonu farklı zamanlarda terk ederek birbirinden ayrılmış olurlar. Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminin bölümleri şu şekilde sıralanabilir (Şekil 11):

- a. Hareketli/ Taşıyıcı Faz Depoları
- b. Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa sistemi
- c. Enjeksiyon (Örnek Yükleme) Sistemi
- d. Ayırma Birimi; Analitik Kolon(lar)
- e. Ölçüm Birimi; Dedektör(ler)
- f. Yazım Birimi; kaydedici, İntegratör
- g. Atık Deposu



Şekil 11. HPLC Cihazı Akış Şeması (72).

HPLC hareketli fazı analiz ettiğimiz maddeleri kolonda sürükleyen çözücü veya çözücü sistemidir. HPLC uygulamalarında hareketli faz (eluent) türü ve bileşimi ayrımı etkileyen faktörlerden biridir. Sistemde kullanılan hareketli fazın seçimi uygulanan ayırma tipine bağlı olmakla birlikte sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar farklı polaritede çözücüler kullanılabilir. HPLC sistemlerinde kullanılacak tüm çözücüler çok saf olmak zorundadır. Çünkü iz miktardaki safsızlıklar kolonu etkileyerek dedeksiyon sisteminde girişime neden olabilirler. HPLC sistemlerinde birçok hareketli faz kullanılmasına rağmen; mobil faz seçimi kullanılan tekniğe, uygun fiyatlı olmasına, dedektör ile uyumluluğuna, kimyasal açıdan inert olmasına, yüksek derecede saf olmasına, numune tipine ve kolona göre olmalıdır (73,74).

Kolon içindeki katı destek maddesi HPLC'nin durgun fazıdır. Örnek solüsyonunun, kolona enjeksiyonu ile durgun fazda bileşenlerin göçü söz konusudur. Uygulanacak kromatografi türünün prensibine göre dolgu maddesinin seçiminde tanecik biçimi, büyüklüğü, tanecik büyüklüğünün dağılımı, gözenek hacmi ve yüzey alanı gibi özellikler rol oynar.

Genelde HPLC çalışma prensibi tek bir çözücüyle veya karıştırılan iki veya daha fazla çözücünün karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Mobil fazın akış hızı, ayırma işlemi süresince aynı olmalı ve çözücü sisteminde herhangi bir hava kabarcığı olmamasına dikkat edilmelidir. Hassasiyet için olası hava kabarcıklarının ve çözünmüş gazların giderilmesi için HPLC cihazlarında pompa ünitesinden önce degaz üniteleri de mevcuttur (70). Pompa yüksek basınçta mobil fazın akışını sağlar ve ayırma esnasında

çözücülerin çeşitli oranlarda karıştırılmasına programlanabilir. HPLC sisteminin en önemli kısmını oluşturan pompa, yüksek basınçta mobil fazın sabit akışını sağlar ve ayırma esnasında çözücülerin çeşitli oranlarda karıştırılmasıyla programlanabilir. Akış hızı kolonun iç çapına bağlıdır; kolonda küçük iç çapı küçük akış hızı gerektirmektedir. Analitik HPLC için tipik olarak 0.5- 5 mL/dk akış hızı 400 bar'a kadar çalışan pompalar üretilir (75).

HPLC'de numune enjeksiyon sistemi analiz edilecek karışımın sisteme verildiği parçadır. HPLC cihazlarında numune iki farklı şekilde sisteme enjekte edilebilir. Bunlar, manuel (elle kumanda edilen) ve bilgisayar kumandalı oto-enjektörler (auto sampler) şeklinde yapılabilir. Manuel olan bir sistemde örnek enjeksiyonu işleminin kolaylıkla yapılabilmesi ve çözücü akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için analiz edilecek örnek çok uçlu bir valfe gönderilir. Bu valf yardımıyla örneğin bulunduğu hareketli fazın kolona doğru taşınması sağlanır (76).

HPLC ile numune bileşenlerinin ayrımı farklı kromatografik teknikler kullanılarak yapılabilmekte ve bu özel uygulama için seçilen teknik, ayrılacak analitlerin özelliklerine göre değişiklik gösterir (77). Çoğu HPLC ayırmalar dağılma tiplerine göre çalışır. Dağılma kromatografisi hareketli ve sabit fazın bağıl polarlığına dayalı olarak iki temel forma ayrılır (70). Normal faz sıvı kromatografisinde maddeler polar kolonda adsorpsiyon prensibiyle ayrılacaksa, sabit faz olarak genellikle polar katılar kullanılırken, hareketli faz çözücüler apolar veya çok az polar sıvılar olmalıdır (hekzan, pentan, kloroform, ksilen vb. ya da bunların karışımları). Analitin tutunması hareketli fazın polaritesi arttıkça azalır. Ters faz kromatografisi en yaygın kullanılan sıvı kromatografisidir. Burada sabit faz apolar iken hareketli faz polardır. Analitler yüzeye apolar fonksiyon gösteren gruplarıyla bağlanırlar. En polar analit, kolonu ilk önce terk eder. Ters faz kromatografisi orta ve yüksek polarlığa sahip olan analitlerin ayrımı için oldukça uygundur. Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilmiş olup, silika jelde modifiye olan oktil (C8) ve oktadesil (C18) en çok kullanılan fazlardır. Ters faz sıvı ve normal faz sıvı kromatografisinde madde, polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolondan alıkonulur ve hareketli fazın polaritesine yakın olan maddeler kolonu ilk önce terk eder.

HPLC sistemlerinin dört temel bileşenlerinden olan dedektör, kolonda birbirinden ayrılan maddelerin bileşenlerinden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan ünedir ve kolondan sonrasına monte edilir. Uygulanmaya başlandığı günden bu yana HPLC sistemlerinde çok sayıda farklı ölçüm ilkelerine dayanan dedektörler geliştirilmiştir. Yaklaşık on iki tane dedektör LC analizlerinde kullanılabilmesine rağmen yaygın olarak dört tanesi kullanılmaktadır. Bunlar; UV dedektör (sabit ve değişebilen dalga boyu), refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometresidir (78).

4.6.1.1.1. Ultraviyole (UV) Dedektör

HPLC sistemlerinde ideal bir dedektör; geniş konsantrasyon aralığında, yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, bilinen seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik rezolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olmalıdır. Böyle bir dedektör analiz yapılacak numunenin cinsine uygun olmasının yanında sıcaklık ve basınçtaki değişimlerde duyarsız olmalıdır. Bu özellikleri sahip olan ve sıvı kromatografisinde yaygın olarak kullanılan dedektörlerden biri ultraviyole dedektörüdür.

Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190-800 nm aralığında ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltilerden sürekli olarak ışın demeti geçerken analitler tarafından ışığın bir kısmı adsorbe edilebilir. Böylece analiz edilmek istenen bileşiğin kalitatif veya kantitatif tayini yapılmış olur (79).

Lambert-Beer kanuna göre zamana karşı absorbans ölçülür. Genellikle tek veya en fazla iki dalga boyunda eş zamanlı ölçüm yapabilmektedir. Diğer dedektörlerin sahip oldukları uygulanabilirlik kısıtlamaları nedeniyle LC sistemlere duyarlı UV dedektörlerin, hem organik hem de inorganik sistemlere uygun, 10^{-4} - 10^{-5} M aralığında tipik duyarlılık değerine sahip olmasından dolayı çalışmalarda en yaygın dedektör tipi olduğu bilinmektedir.

Zamanla UV dedektörü geliştirilerek modifiye edilmiş ve çalışmalar sonucunda, döteryum veya tungsten lambalı ışık kaynaklı diyot serili spektrofotometreler (DAD)

kullanılmaya başlanmıştır. UV dedektörü ile aynı çalışma prensibine sahip yani zamana karşı absorbans ölçülür.

Fotodiyot dizisi dedektörün (Photodiode array dedector- DAD) UV dedektöründen farkı, 512 elementten oluşan bir yüzeyde ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak spektrum alabilme özelliğine sahiptir. Bu özelliği nedeniyle kromatogramda yer alan tüm piklerin arzu edilen dalga boyu aralığındaki spektrumlarını da gösteren üç boyutlu (x, y ve z) kromatogramlarına sahip olmasından ötürü karışık örneklerde pik teşhislerinin daha sağlıklı bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlar.

4.6.1.1.2. Fotodiyot Dizisi (DAD) Dedektör

Fotodiyot dizisi dedektörü UV-Vis dedektörünün daha gelişmiş bir modelidir. Bu sistemin UV-Vis dedektöründen farkı, 512 diyotdan oluşan bir yüzeyde, her diyodun ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı ve anlık spektruma alabilme özelliğine sahiptir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır (80). HPLC-DAD kombine sistemi ile analitlerin HPLC ile alıkonma zamanlarına ilave olarak eş zamanlı alınabilen spektrumları sayesinde doğru tanımlanmaları mümkündür.

4.6.1.1.3. Refraktif İndeks (RID) Dedektör

Işın fiziksel yoğunlukları farklı olan bir ortamdan diğerine geçerken, bu iki ortamdaki hız farkı nedeniyle aniden yön değiştirir. Bir maddenin refraktif indeksi, bir ortamdan diğerine geçen paralel ışın demetinin yönündeki değişikliğin (kırılma) kırılma indisi ölçülür. Örnek bileşenlerinin bulunduğu ortamda yoğunluk artacağından gelen ışık kırılarak hücreyi terk eder. Refraktif indeksleri farklı olan iki ortam arasına giren ışının bir bölümü yansımaya uğrar ve ortamlar arasındaki refraktif indeks farkı ne kadar büyük olursa ışının yansıyan bölümü de o kadar büyük olur. Işığın ölçülen kırılma oranından (kırılma indisi) kantitatif tayin yapılabilir. LC uygulamalarında refraktif indeks dedektörü en az hassasiyette olan dedektörüdür. Çevre sıcaklığı, basınç, akış hızı değişikliğinde dedektörün algılaması da değişmektedir. Noniyonik, UV

bölgede absorpsiyon yapamayan maddeler ve flüoresans olmayan bileşikler için uygun olan RID'leri; diferansiyel indeks, frensel metodu, christiansen etki, interferometre ve dielektrik sabiti gibi dedektör çeşitleri bulunmaktadır.

LC sistemlerde konsantrasyon hassasiyeti ayrımı için RID genellikle kullanılmaktadır (81). Normal faz sıvı kromatografisinde kullanılan RID kolon dolgu maddeleri silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar ise daha düşük polariteli çözücülerdir. Silika üzerine farklı polaritelerdeki -CN, -NO₂ ve -NH₂ gibi gruplar bağlanarak farklı sabit fazlar elde edilebilir. RID'de daha çok NH₂ kolonu kullanılmaktadır. Refraktif indeks dedektörü sıcaklık ve dalga boyundaki değişimlere karşı hassas olduğundan belirli bir sıcaklık (20 °C ve dalga boyu (589.3 nm) aralığında çalışılmaktadır. Refraktif indeks dedektörü kantitatif tayinlerde kullanılmakta olup yaygın olarak karbonhidrat miktarı tayinleri için RID kullanılmaktadır.

5. YAPILAN ÇALIŞMALAR

5.1. Kullanılan cihazlar

Yapılan analizlerde kullanılan cihazlar marka/model olarak Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan Cihazlar ve Marka/Modelleri

Cihaz Adı	Marka/Model
LC-UV	Elite LaChrom, Hitachi, Japonya
UV-vis spektrofotometre	Spectro UV-Vis Double Beam PC LaboMed Inc., Los Angeles, CA, USA
pH metre	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland
Hassas Terazi	Presica LX 320 A, Dietikon, Switzerland
Saf Su Cihazı	Human, Zeneer Navi UP, Song Pa-Ku, Seoul, Korea
Vorteks karıştırıcı	Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, USA
Etüv	Nüve, EN 400, Ankara, Türkiye
Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR HEI-Standard, Schwabach, Germany
Rotary evaporatör	IKA®-Werke, RV 05 Basic, Staufen, Germany
Vakum Pompası	Buchi Vacuum Pump V-700, Flawil, Switzerland
Yarı otomatik pipetler	Eppendorf Research® Plus Hamburg, Germany

5.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan temel kimyasal madde ve malzemeler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar ve Satın Alınan Firma

Kullanılan Kimyasal	Satın Alındığı Firma
Gallik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -OH benzoik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>t</i> -sinnamik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Vanilik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kaffeik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Şiringik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Epikateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -kumarik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Ferulik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Rutin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Luteolin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetonitril-LC Saflıkta	Merck, Darmstadt, Germany
Metanol-LC Saflıkta	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetik Asit	Merck, Darmstadt, Germany
HCl	Merck, Darmstadt, Germany
Folin-Ciocalteu’s phenol reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Etanol	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany

5.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 4’da verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Çözelti	Hazırlanışı
HPLC-UV ile Fenolik Bileşen Analizleri İçin	
Gallik asit	%50-50 metanol-saf suda hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltiden, 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%50-50 metanol-saf su) seyreltilir.
Protokatekuik asit	
<i>p</i> -OH benzoik asit	
Vanilik asit	
Kaffeik asit	
Şiringik asit	
<i>p</i> -Kumarik asit	
Ferulik asit	
Kateşin	%100 metanolle hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltiden, 1- 2- 5- 10- 20- 30 ppm olacak şekilde çözücüsüyle (%100 metanol) seyreltilir.
Epikateşin	
Rutin	
% 2’lik Asetik Asit	20 mL glasiyel asetik asit balon jojede saf su ile 1000 mL’ye tamamlanır.
%70-30 Asetonitril-saf su	700 mL asetonitril balon jojede saf su ile 1000 mL’ye tamamlanır.
Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin	
0,2 N Folin-Ciocalteu	2 N Folinden 1:10 oranında saf suyla seyreltilerek kullanılır.
% 10’luk Na ₂ CO ₃	10 g Na ₂ CO ₃ 90 mL suda çözülür, 100 mL’ye tamamlanır.
Gallik Asit (1 mg/mL)	Metanolle hazırlanan stok çözeltiden, 0,5- 0,25- 0,125- 0,0625- 0,03125 mg/mL olacak şekilde metanolle seyreltilerek hazırlanır.
Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç -FRAP İçin	
HCl (40 mM)	Yaklaşık 20 mL saf suyun üzerine % 37’lik HCl’den 340 µL ilave edilir ve saf suyla 100 mL’ye tamamlanır.
TPTZ (10 mM)	234,249 mg TPTZ stok maddeden tartıldı, 75 mL 40 mM’lık HCl içinde çözüldü.
FeCl ₃ (20 mM)	324,4 mg FeCl ₃ destile suyla 100 mL’ye tamamlandı.
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	2,325 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ilave edildi.750 mL’ye saf suyla tamamlandı.
FRAP Reaktifi	300 mM pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl ₃ (10:1:1) oranında karıştırılarak taze hazırlanır.
Troloks [®] (0,02 mg/mL)	10 mg troloks 10 mL metanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlanır. 0,02 mg/mL’lik ara stok çözelti metanolle seyreltilerek kullanılır.
DPPH’ Radikal Temizleme Aktivitesi İçin	
DPPH’ Reaktifi (0,1 mM)	100 mL’si için; 3,94 mg DPPH’ tartılır, 90 mL metanolle çözülür ve 100 mL’ye tamamlanır.
Troloks [®] (0,02 mg/mL)	10 mg troloks 10 mL metanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlanır. 0,02 mg/mL’lik ara stok çözelti metanolle seyreltilerek kullanılır.

5.4. Bitkinin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan 8 adet bitki örneği Trabzon'un değişik bölgelerinden (Tablo 5) 2013 yılında toplandı. Bitkinin çiçek ve yaprak-dal kısımları açık havada kurutulup öğütücü ile toz haline getirildi.

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Bitki Türleri, Kodları ve Toplanma Bölgeleri

Bitki	Kod	Bölge
<i>Primula vulgaris subsp. sibthorpii</i> yaprak-dal	ASM(y-d)	Akçaabat
<i>Primula vulgaris subsp. sibthorpii</i> mor çiçek	ASM(ç)	Akçaabat
<i>Primula vulgaris subsp. vulgaris</i> yaprak-dal	MVS(y-d)	Maçka
<i>Primula vulgaris subsp. vulgaris</i> sarı çiçek	MVS(ç)	Maçka
<i>Primula vulgaris subsp. sibthorpii</i> yaprak-dal	TSB(y-d)	Bostancı
<i>Primula vulgaris subsp. sibthorpii</i> beyaz çiçek	TSB(ç)	Bostancı
<i>Primula vulgaris subsp. vulgaris</i> yaprak-dal	MVM(y-d)	Maçka
<i>Primula vulgaris subsp. vulgaris</i> mor çiçek	MVM(ç)	Maçka

Her bir bitkinin çiçek ve yaprak-dal kısımlarından 0.5 g alınarak etanollü ve sulu ekstraktların hazırlanması için çalkalayıcıda 24 saat boyunca tutulmuştur. Çözeltideki katı partiküllerin arındırılması için önce normal süzgeç kağıdı daha sonra mavi bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzme işlemi gerçekleştirildi. Konsantrasyonları son hacimleri (50 mL) ayarlanarak belirlendi. Analiz yapılana kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Her bir etanol ve su ekstraktının konsantrasyonu (10 mg/mL), belli bir hacimde alınan ekstraktın evaporasyonu sonucu elde edilen kuru toz halinin ağırlığı ile hesaplandı.

5.4.1. Döner Vakum Evaporatörü İle Çözücü Uçurulması

Döner vakum evaporatörü ile tek basamaklı destilasyonları yapmak mümkündür. Bu tip evaporatörde dönen buharlaştırıcı bir balon kullanılarak çözücüler buharlaştırılabilir ve yoğunlaştırılabilir. Vakum kaynama sıcaklığını düşürdüğü için destilasyonların vakum altında yapılması performansı artırır ve ürünleri korumaya yardım eder. Bu sistemde ikinci bir yoğunlaştırıcı ile vakum kontrolörü vardır. Büyük ve küçük uçurma balonlarının ısıtılması oval şekilli su banyosu ile sağlanır (Şekil 12).



Şekil 12. Döner Vakum Evaporatörü

5.5. RP- HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Tayini

5.5.1. RP-HPLC-UV Koşulları

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda (280 ve 315 nm) aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC sisteminde yapıldı. Analizler ters faz C₁₈ kolonu (150 mm x 4.6 mm, 5µm; Fortis) kullanarak ve asetronitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (82). A rezervuarında % 2 asetik asit (saf suda) ve B rezervuarında % 70- 30 asetronitril-saf su bulunan gradient program Tablo 6’da verilmiştir. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 25 µL’ye, mobil faz akış hızı 1.2 mL/dk’ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C’ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı.

Tablo 6. RP-HPLC-UV Gradient Programı

Zaman (dk)	A	B
	% 2 asetik asit (saf suda)	% 70-30 asetronitril-saf su
0.01	95.00	5.00
3.00	95.00	5.00
8.00	85.00	15.00
10.00	80.00	20.00
12.00	75.00	25.00
20.00	60.00	40.00
30.00	20.00	80.00
35.00	95.00	5.00
50.00	95.00	5.00

5.6. Çalışmada Kullanılan Antioksidan Yöntemler

Primula vulgaris ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde üç farklı yöntem kullanılmıştır.

5.6.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Çalışmada, standart garfiğin hazırlanmasında, fenolik bir madde olan gallik asit standardı kullanılmıştır (60,65). Gallik asitin farklı konsantrasyonları (1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 ve 0.03125 mg/mL) hazırlanıp, absorbansları 760 nm’de okunmuştur. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbans değerleri ile grafik çizilmiştir. Çizilen grafiğe göre bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı bulunmuş, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak asıl numunenin mg GAE (Gallik asit eşdeğeri)/g numune olarak fenolik madde miktarı bulunmuştur. Yapılan çalışmada pipetleme işlemi Tablo 7’deki gibidir.

Tablo 7. Toplam Polifenolik Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi

	Kör	Standart	Numune
Distile su	700 µL	680 µL	680µL
Standart	-	20 µL	-
Bitki Ekstraktı	-	-	20 µL
0,2 N Folin Reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vorteks ile karıştırılır ve 3 dakika sonra			
%10 Na ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL
760 nm’de köre karşı absorbans okunur.			

5.6.2. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Tayini

FRAP metodu (Fe(III)-TPTZ- 2,4,6-tris (2-pyridlyl)-S-triazin) kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks Fe(II)-TPTZ oluşması ve bu kompleksin 593 nm’de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (69). FRAP yöntemi nispeten basit bir yöntem olup, kolaylıkla standardize edilebilmektedir. Bitki ekstraktlarındaki antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde FRAP (Fe (III) indirgeme gücü metodu geçerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (62).

Kalibrasyon için Troloks’un değişen konsantrasyonları (31.25; 62.5; 125; 250; 500; 1000 µM) kullanılarak çalışma eğrisi hazırlandı. Devamında 3 mL FRAP reaktifi

[300 mM pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl₃ (10: 1: 1)] ile 100 µL numune karıştırıldı. 4 dakika sonra 593 nm’de absorbanslar okundu. Sonuçlar (numunelerin FRAP değerleri) aynı şartlarda test edilmiş standart Troloks®’la karşılaştırmalı olarak bulunarak µM Troloks® eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi. Pipetleme işlemi Tablo 8’deki gibidir.

Tablo 8. FRAP Tayininde Yapılan Pipetleme İşlemi

	Kör _{MeOH}	Test (Numune)	Renk Körü _(MeOH)	Troloks®
FRAP Reaktifi	3 mL	3 mL	-	3 mL
Numune (Etanolik)	-	100 µL	100 µL	-
Numune (Sulu)	-	100 µL		
Troloks (Değişen kons.)	-	-	-	100 µL
Metanol	100 µL	-	3 mL	-

4. dakikada 593 nm’de absorbans okunur.

Renk Körü_{test(met)} : Metanolde çözünen numune için renk körü

5.6.3. DPPH[•] Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

DPPH[•] radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denemelerde satın alınan bu radikalın 100 µM’lık metanolik çözeltisi kullanıldı. Bitki numunelerinin metanolik ekstraktları kendi çözümleri ile seyreltilerek değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Eşit hacimde (750 µL) DPPH[•] çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika bekletildi. Süre sonunda DPPH[•]’ın maksimum absorbans verdiği 517 nm’de absorbanslar okundu. Tanık olarak DPPH[•] çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC₅₀ değerleri hesaplandı. Tüm numuneler 3 tekrarlı çalışıldı. Pipetleme işlemi Tablo 8’deki gibidir.

Tablo 9. DPPH Yöntemi İçin Pipetleme İşlemi

	Numune Tanık Tüpü	Reaktif Tanık Tüpü	Numune Tüpü
Numune (Değişik konsantrasyon)	750 µL	-	750 µL
Metanol	750 µL	750 µL	-
DPPH [•] (100 µM)	-	750 µL	750 µL
Çözücü	-	750 µL	-

50 dk. Süre sonunda 517 nm’de absorbens okunur.

5.6.3.1. SC₅₀ Değerlerinin Bulunması

SC₅₀ radikal etkisini yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 6 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbens ölçümleri yapıldı ve absorbensler konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbensin yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı SC₅₀ değerini vermektedir. SC₅₀ değeri mg/mL ya da g/mL cinsinden hesaplanmaktadır.

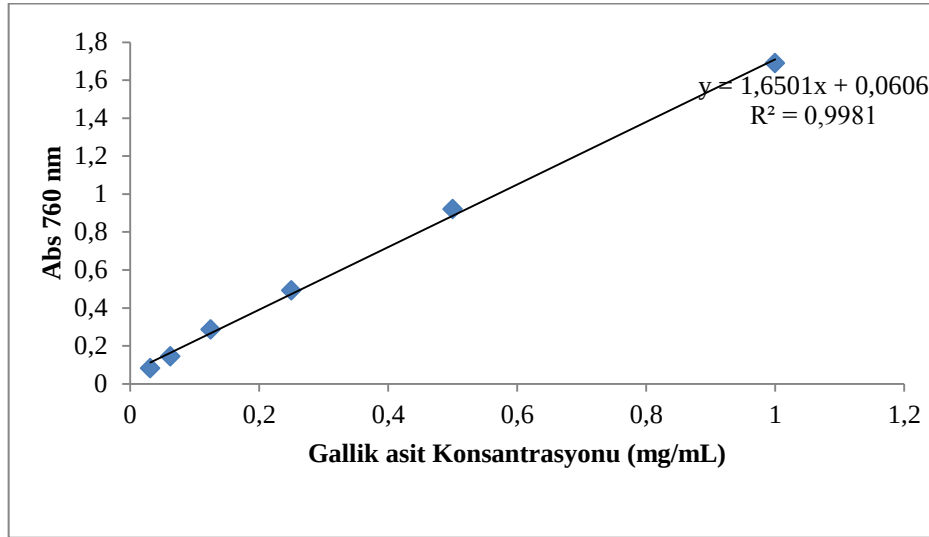
5.6.4. İstatistiksel Analiz

Analizler en az 3 testin ortalaması alınarak yapıldı ve sonuçlar ortalama değer ve standart sapma cinsinden (Ort±SP) hesaplandı. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 9.0 istatistik paket programı kullanıldı. Grupların toplam fenolik madde, FRAP ve DPPH seviyelerinin değerleri (Ort±SP) Kruskal Wallis testi ile incelendi. İkili grup karşılaştırma için yanılma düzeyi aşağı çekilerek Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki bağımsız grup arasında ilişki olup olmadığı Spearman’s korelasyon testine göre ve önemlilik testleri p<0.05 seviyesinde incelendi.

6. BULGULAR

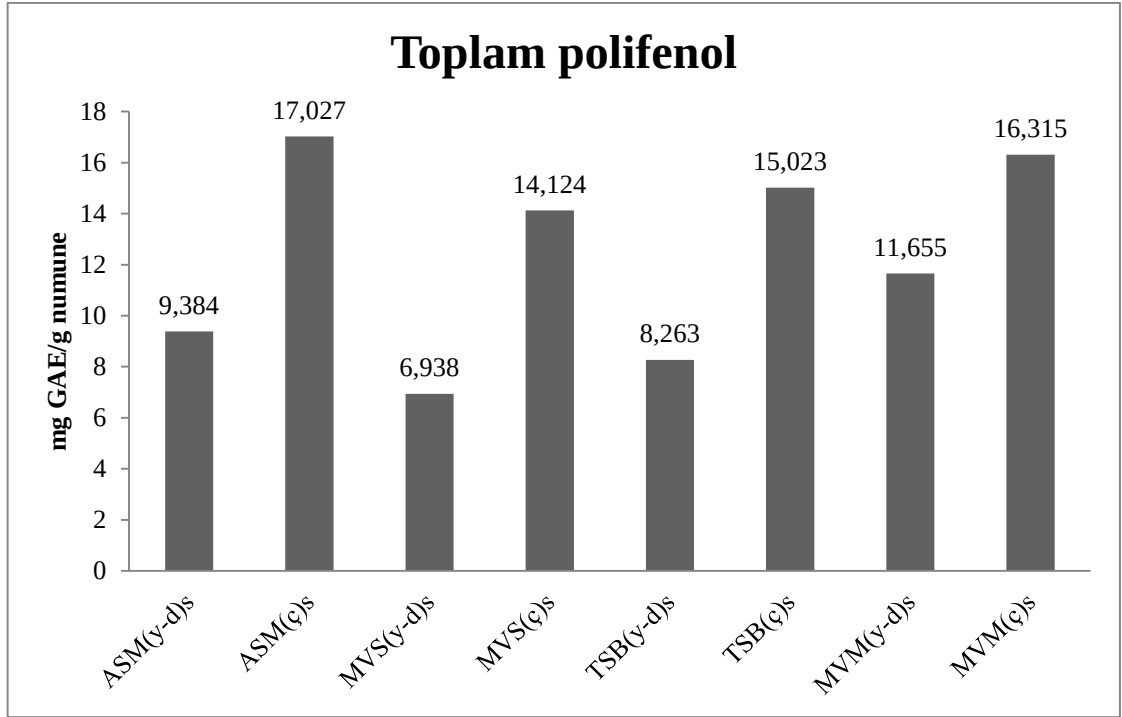
6.1. Toplam Polifenol Testi Sonucu

Analizler için bitki örnekleri etanolik ve sulu ekstraktları hazırlanarak gerekli seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra toplam fenolik madde miktarı gallik asit standardına göre tayin edildi. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart gallik asit çözeltileri ile Bölüm 5.6.1.'de anlatılan metoda göre toplam fenolik madde miktarları tayin edildi. Elde edilen 765 nm'deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y=1,650x+0,0606$ olarak tespit edildi (Şekil 13). Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak 1 g bitkinin içerdiği mg cinsinden toplam fenolik madde miktarı belirlendi.

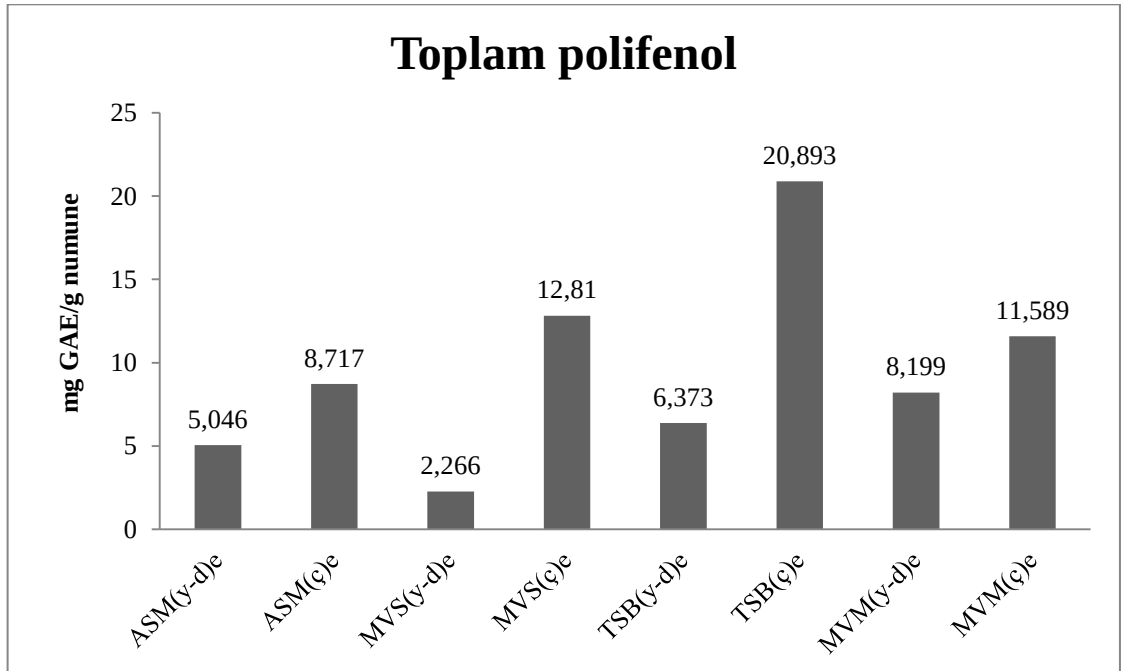


Şekil 13. Toplam Polifenolik Madde Tayini İçin Gallik Asit Standardı Kullanılarak Hazırlanan Standart Çalışma Grafiği

Bitkilerin toplam fenolik madde miktarları Tablo 10 ve 11'deki gibidir. Ayrıca çalışılan bitki örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarını karşılaştırmak amacıyla hazırlanan sütun grafiği de şekil 14 ve 15'de verilmektedir. Toplam fenolik madde miktarı 2.266-20.893 mg GAE/ g numune arasında değişim göstermektedir. En yüksek değer TSB(ç)_e 'de tespit edilirken en düşük değer MVS(y-d)_e 'de tespit edildi.



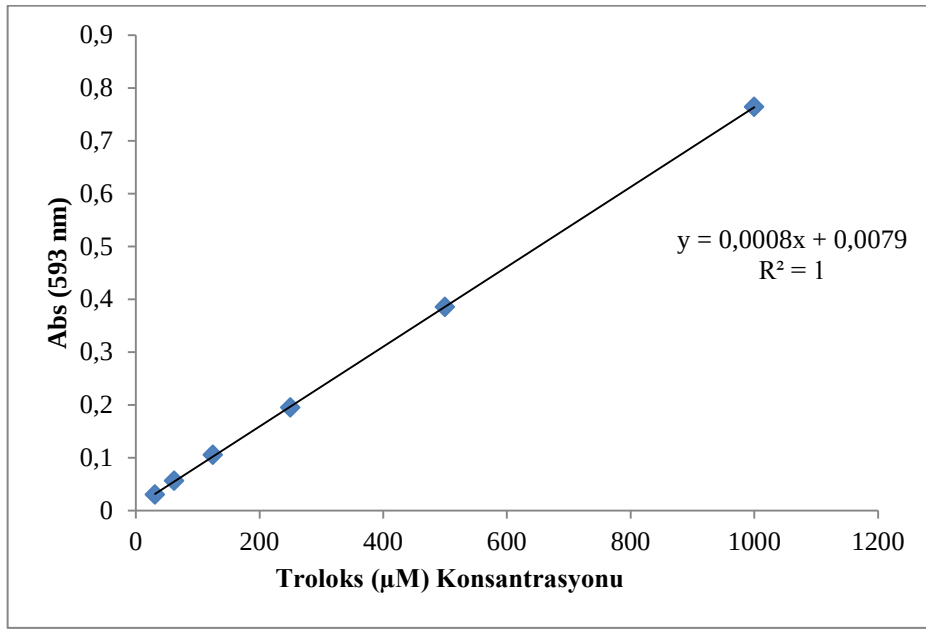
Şekil 14. Trabzon Bölgesi *Primula vulgaris* Örneklerinin Sulu Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Karşılaştırılması



Şekil 15. Trabzon Bölgesi *Primula vulgaris* Örneklerinin Etanolik Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Karşılaştırılması

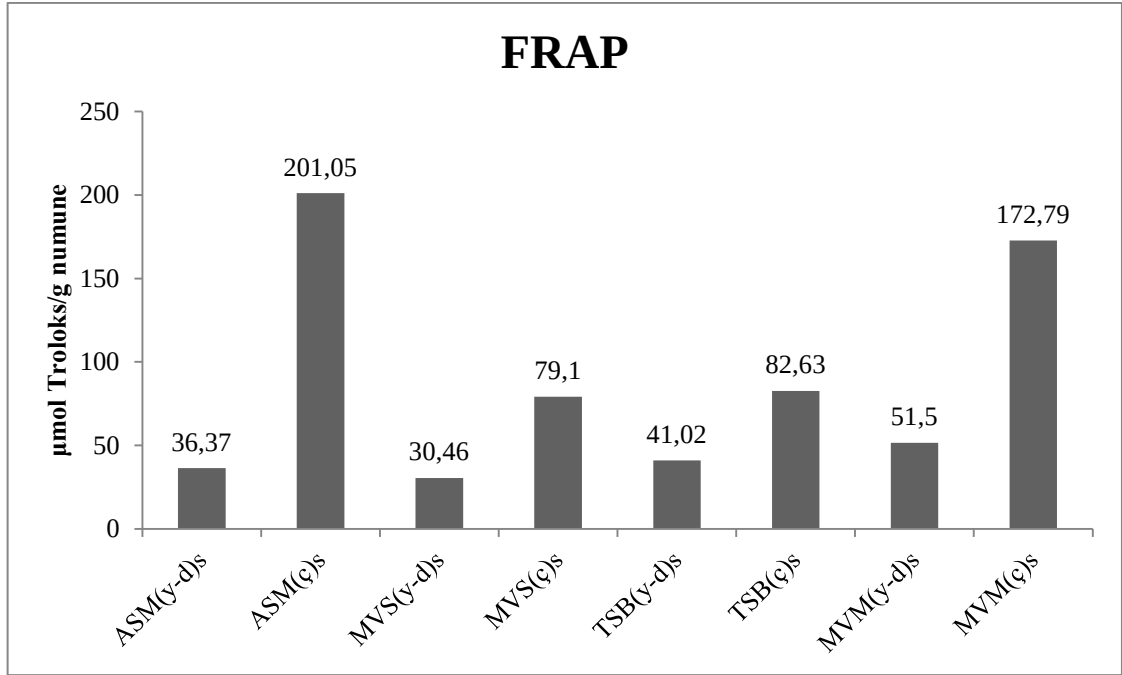
6.2. FRAP Testi Sonucu

FRAP testi toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde en iyi sonuç veren metottur. FRAP yönteminin ilkesi; antioksidan içeren bir örneğin eklenmesi sonucu, oksidan olarak kullanılan ferrik-tripiridiltriiazin kompleksinin, renkli formdaki ferro (Fe^{2+}) formuna indirgenmesine dayanmaktadır. Standart antioksidan olarak sentetik ve ticari olarak satın alınabilen Troloks bileşiği kullanılmıştır. Kalibrasyon için Troloks değişik konsantrasyonları (31.25-1000 μM) kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 16’de verilmektedir.

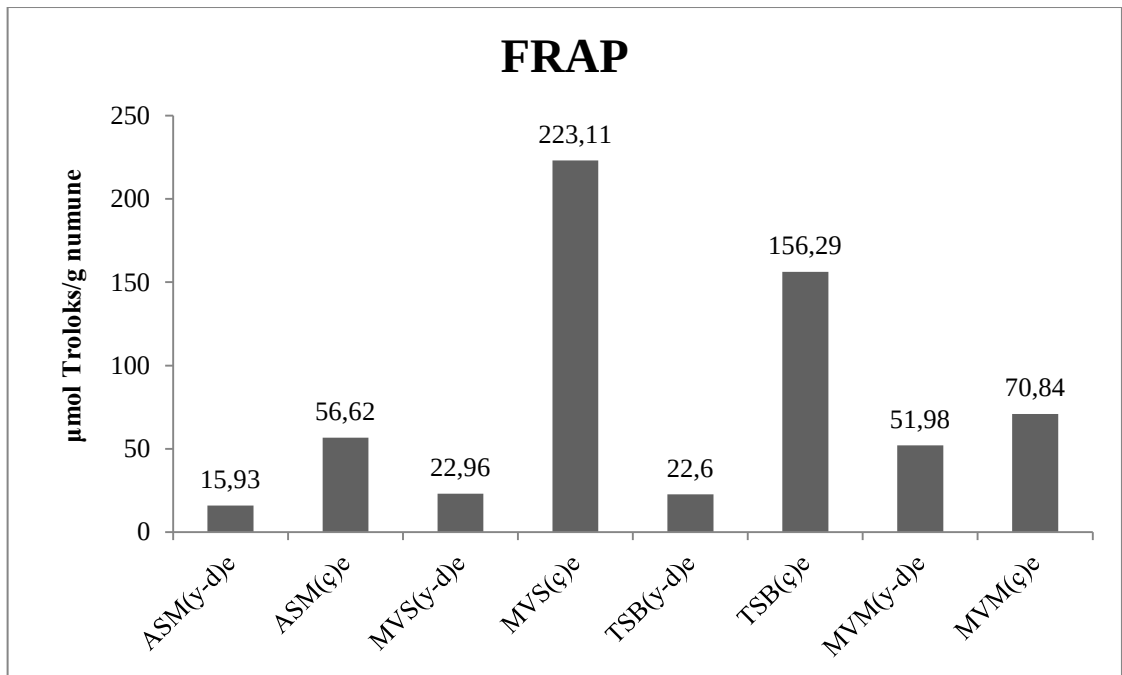


Şeki 16. FRAP Testi İçin Troloks Standardı Kullanılarak Elde Edilen Standart Çalışma Grafiği

Bitkilerin FRAP sonuçları Tablo 10 ve 11’deki gibidir. FRAP değeri 15.93-223.11 μmol Troloks/g numune arasında değişim göstermektedir. En yüksek değer MVS(ç)_e’de en düşük değer ASM(y-d)_e’de tespit edildi. Ayrıca Troloks eşdeğeri cinsinden 8 adet sulu ve 8 adet etanolik bitki örneklerine ait FRAP değerleri şekil 17 ve 18’de sütun grafik olarak da gösterilmektedir.



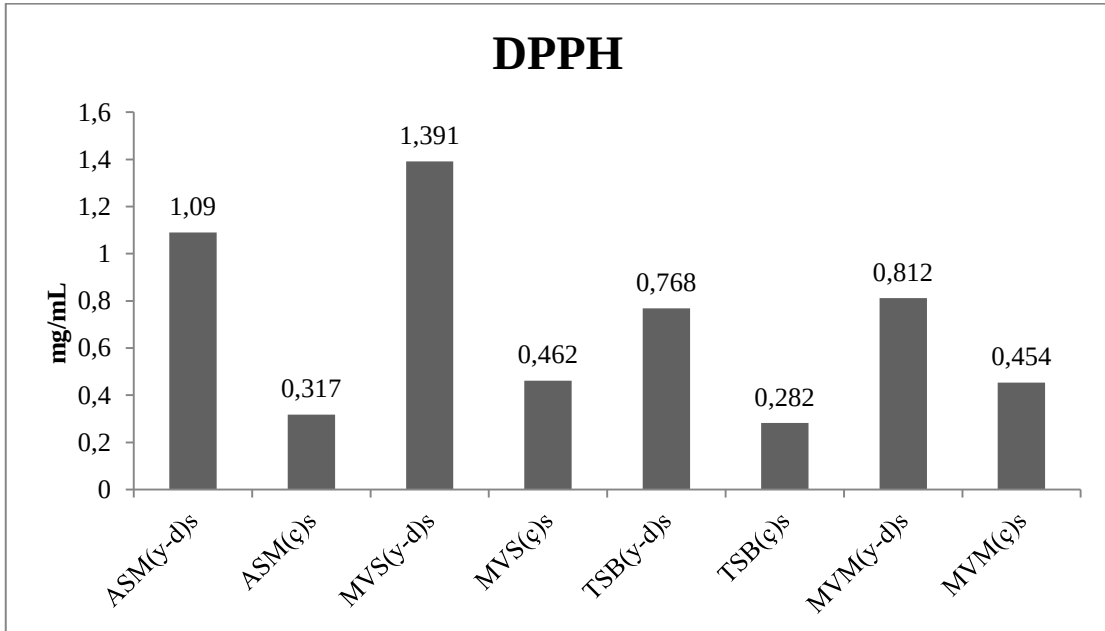
Şekil 17. Trabzon Bölgesi *Primula vulgaris* Örneklerinin Sulu Ekstraktlarındaki FRAP Antioksidan Değerlerinin Karşılaştırılması



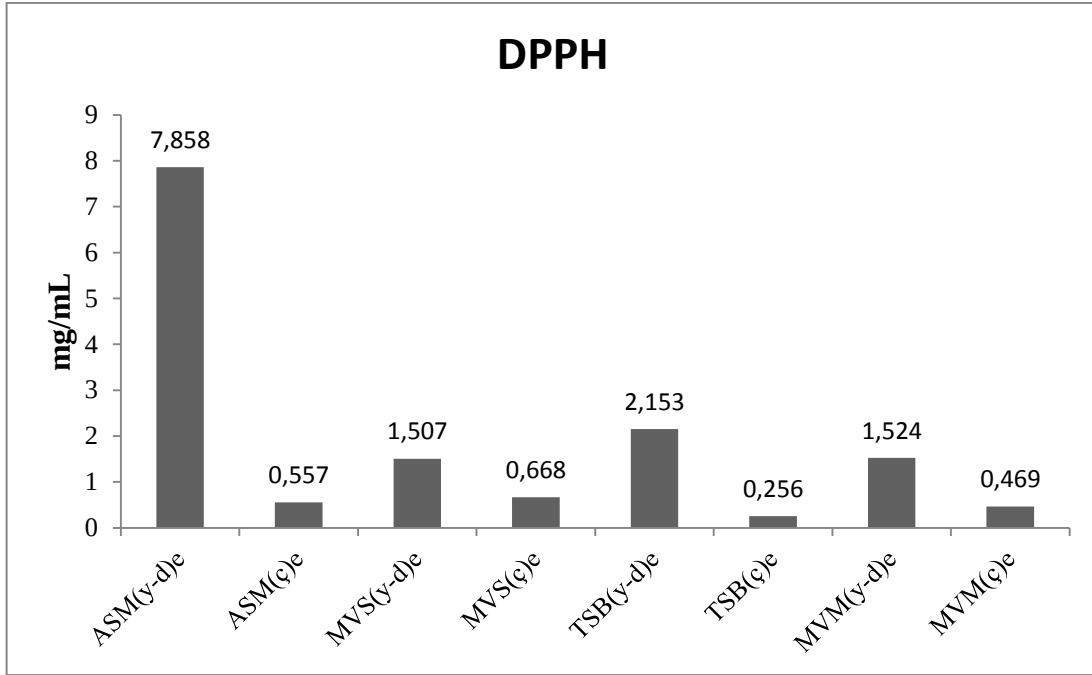
Şekil 18. Trabzon Bölgesi *Primula vulgaris* Örneklerinin Etanolik Ekstraktlarındaki FRAP Antioksidan Değerlerinin Karşılaştırılması

6.3. DPPH' Testi Sonucu

DPPH' radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen ve radikal temizleme aktivitesinde çok yaygın olarak kullanılabilen bir radikaldir. Bu radikalin 100 μM 'lık metanolik çözeltisi hazırlandı. Etanolik ve sulu bitki ekstraktlarından 6 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanarak bunlardan 750 μL alındı. Üzerlerine 750 μL DPPH' çözeltisi koyularak 50 dakika inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda 517 nm'de absorbans değerleri okundu. Artan numune konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek maksimum absorbansı yarıya düşüren numune konsantrasyonu SC_{50} değeri olarak ifade edildi. Burada antioksidan aktivite, numunelerin SC_{50} mg/mL cinsinden değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. DPPH' radikali temizleme tayininde düşük SC_{50} değeri yüksek radikal temizleme kapasitesini, yüksek SC_{50} değeri ise düşük radikal temizleme kapasitesini göstermektedir. Tablo 10 ve 11'de numunelerin SC_{50} değerleri verilmiştir. Ayrıca sütun grafiği olarak da şekil 19 ve 20'de değerler gösterilmiştir. Bitkilerin SC_{50} değerleri 0.256-7.858 mg/mL arasında değişim göstermektedir. Sonuçlara göre en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip TSB(ç)_e olarak bulundu. En düşük temizleme aktivitesine sahip ise ASM(y-d)_e olarak bulundu.



Şekil 19. Trabzon Bölgesi *Primula vulgaris* Örneklerinin Sulu Ekstraktlarındaki DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Değerlerinin Karşılaştırılması



Şekil 20. Trabzon Bölgesi *Primula vulgaris* Örneklerinin Etanolik Ekstraktlarındaki DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Değerlerinin Karşılaştırılması

Tablo 10. Trabzon'un Değişik Bölgelerinden Toplanan *Primula Vulgaris* Örneklerinin Sulu Ekstraktlarında Bulunan Toplam Fenolik Madde Ve Antioksidan Aktivite Değerleri (Ort±SP)

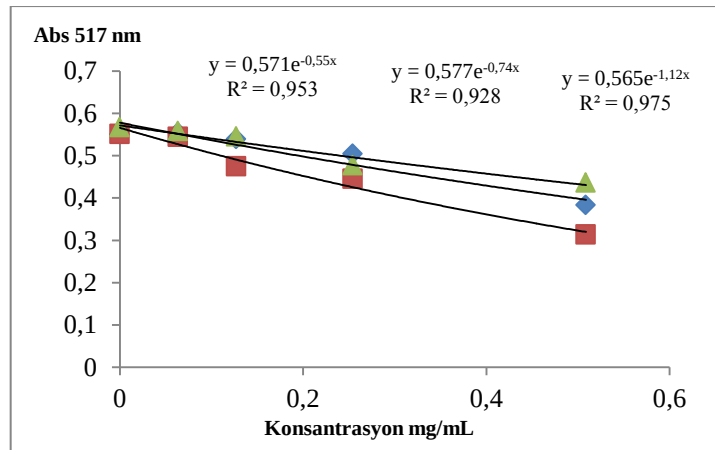
Yaprak-dal kısmının sulu ekstraktı	ASM(y-d) _s	MVS(y-d) _s	TSB(y-d) _s	MVM(y-d) _s	p
Bölge	Akçaabat	Maçka	Bostancı	Maçka	
Toplam polifenol (mg GAE/g numune)	9,384±0,126	6,938±0,632	8,263±0,548	11,655±0,169	0,053
FRAP (µmolTroloks/g numune)	36,370±0,620	30,460±0,000	41,020±0,460	51,500±0,150	0,015
DPPH SC₅₀ (mg/mL)	1,090±0,227	1,391±0,060	0,768±0,006	0,812±0,068	0,114
Çiçek kısmının sulu ekstraktı	ASM(ç) _s	MVS(ç) _s	TSB(ç) _s	MVM(ç) _s	
Toplam polifenol (mg GAE/g numune)	17,027±1,263	14,124±0,590	15,023±0,843	16,315±0,127	0,376
FRAP (µmolTroloks/g numune)	201,050±0,310	79,100±1,240	82,630±0,310	172,790±0,620	0,016
DPPH SC₅₀ (mg/mL)	0,317±0,014	0,462±0,004	0,282±0,001	0,454±0,038	0,025

Tablo 11. Trabzon'un değişik Bölgelerinden Toplanan *Primula vulgaris*  rneklerinin Etanolik Ekstraktlarında Bulunan Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Değerleri (Ort SP)

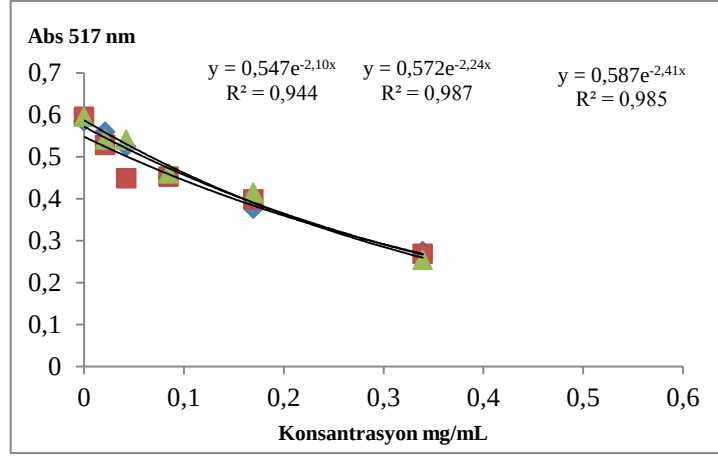
Yaprak-dal kısmının etanolik ekstraktı	ASM(y-d) _e	MVS(y-d) _e	TSB(y-d) _e	MVM(y-d) _e	p
Bölge	Akçaabat	Maçka	Bostancı	Maçka	
Toplam polifenol (mg GAE/g numune)	5,046�0,211	2,266�0,000	6,373�0,212	8,199�0,042	0.015
FRAP (�molTroloks/g numune)	15,930�0,080	22,960�0,000	22,600�0,470	51,980�0,540	0.022
DPPH SC ₅₀ (mg/mL)	7,858�0,271	1,507�0,030	2,153�0,006	1,524�0,006	0.022
�i�ek kısmının etanolik ekstraktı	ASM(�) _e	MVS(�) _e	TSB(�) _e	MVM(�) _e	
Toplam polifenol (mg GAE/g numune)	8,717�0,127	12,810�0,084	20,893�0,803	11,589�0,211	0.019
FRAP (�molTroloks/g numune)	56,620�1,160	223,110�7,340	156,290�2,790	70,840�0,700	0.016
DPPH SC ₅₀ (mg/mL)	0,557�0,010	0,668�0,009	0,256�0,004	0,469�0,002	0.016

6.3.1. DPPH Aktivitesi  in SC₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

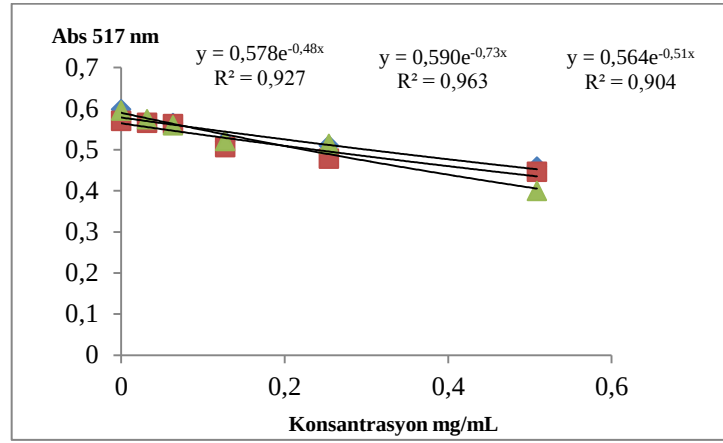
SC₅₀ değerin bulunması  in farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda en az 6 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonları hazırlanarak absorbans ölçümleri yapıldı ve bu absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe ge iridi. SC₅₀ değeri mg/mL cinsinden ifade edildi. Grafikleri aşağıdaki şekillerde yer almaktadır.



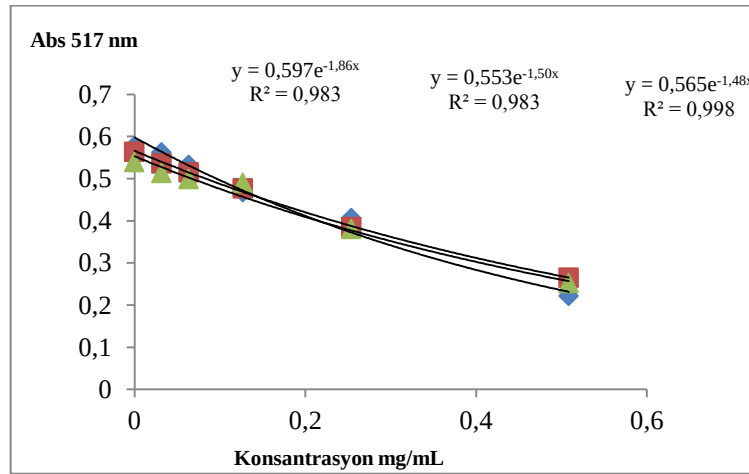
şekil 21. Bitkinin Yaprak-dal Kısımının Sulu [ASM(y-d)s] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



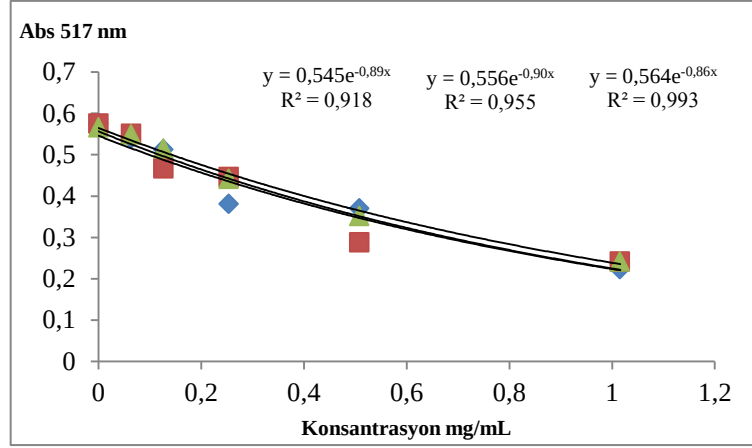
Şekil 22. Bitkinin Çiçek Kısımının Sulu [ASM(ç)s] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



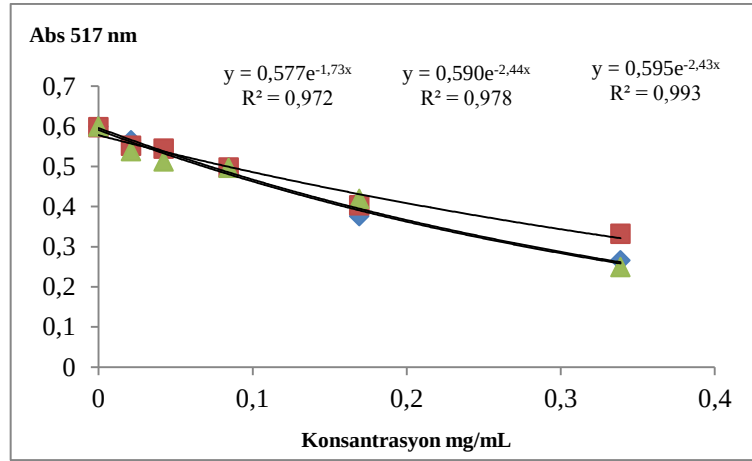
Şekil 23. Bitkinin Yaprak-Dal Kısımının Sulu [MVS(y-d)s] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



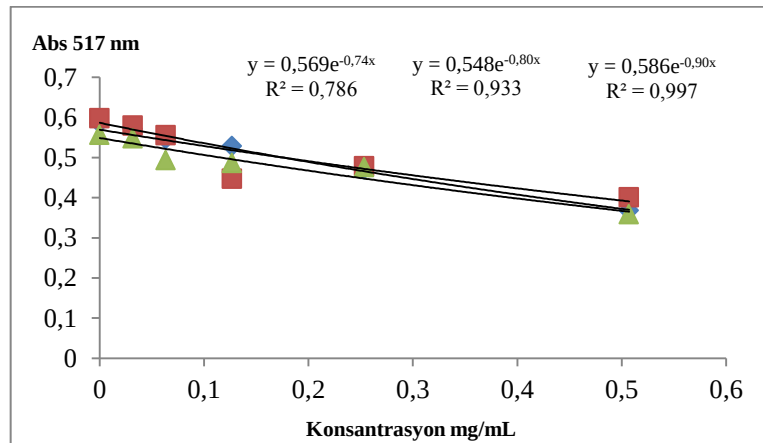
Şekil 24. Bitkinin Çiçek Kısımının Sulu [MVS(ç)s] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



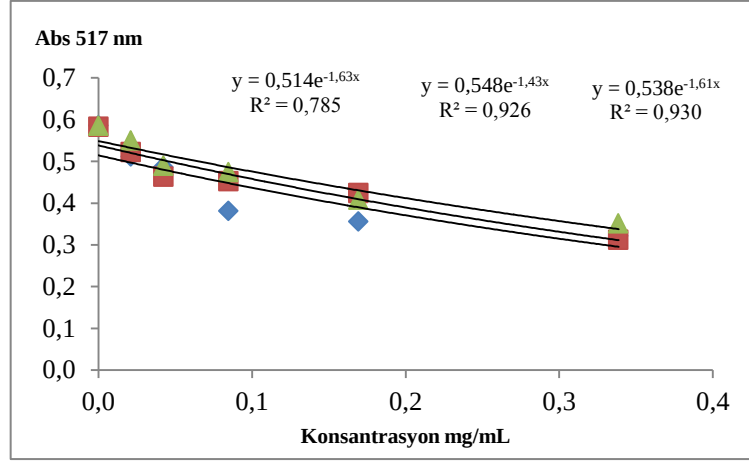
Şekil 25. Bitkinin Yaprak-Dal Kismının Sulu [TSB(y-d)s] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



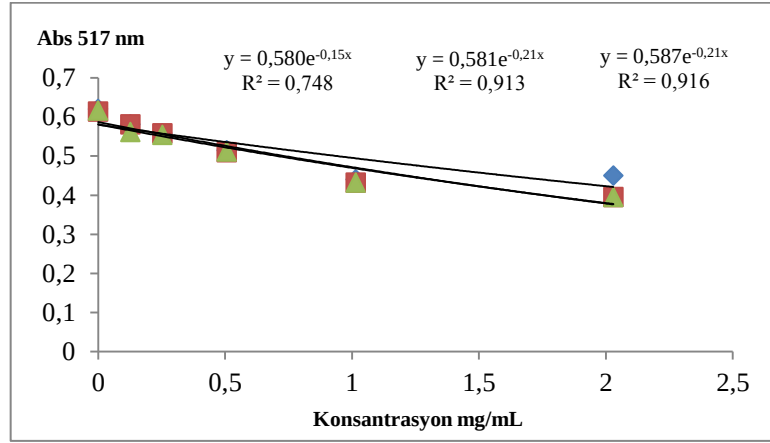
Şekil 26. Bitkinin Çiçek Kismının Sulu [TSB(ç)s] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



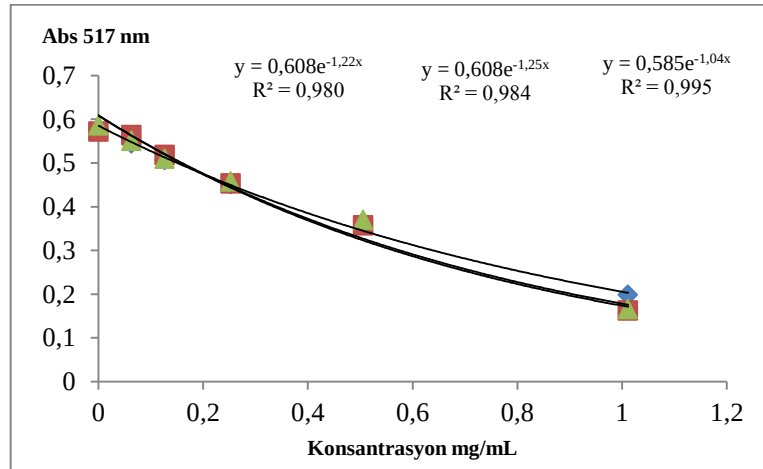
Şekil 27. Bitkinin Yaprak-Dal Kismının Sulu [MVM(y-d)s] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



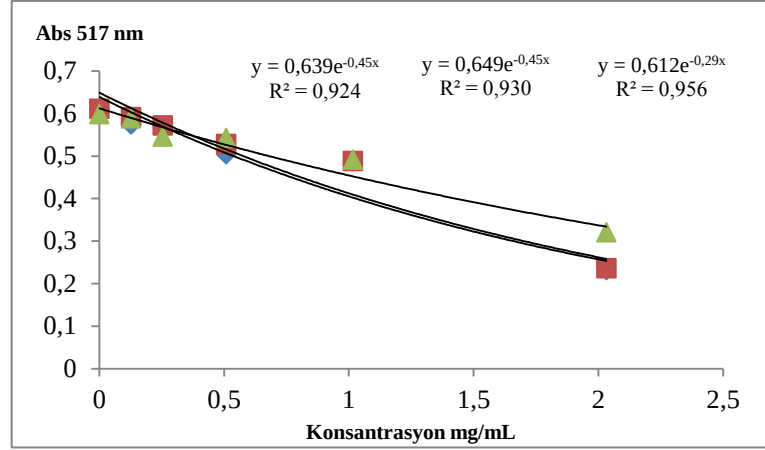
Şekil 28. Bitkinin Çiçek Kısımının Sulu [MVM(ç)s] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



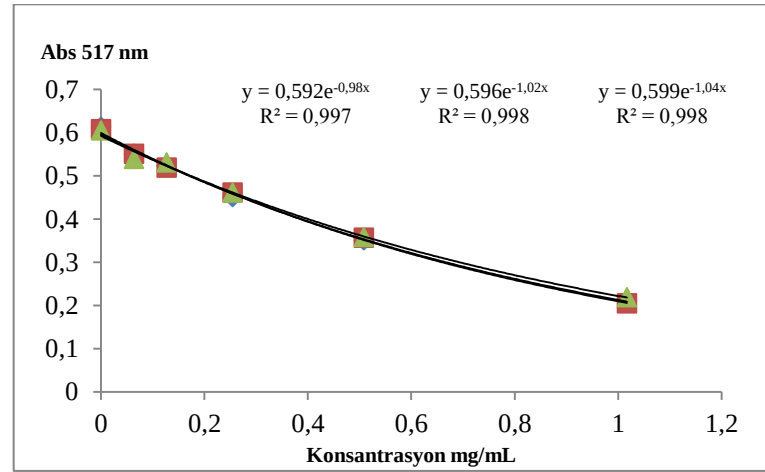
Şekil 29. Bitkinin Yaprak-Dal Kısımının Etanolik [ASM(y-d)e] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



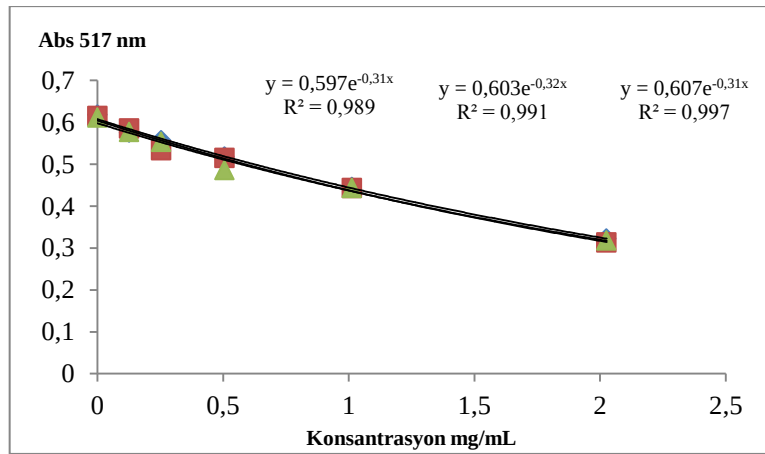
Şekil 30. Bitkinin Çiçek Kısımının Etanolik [ASM(ç)e] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



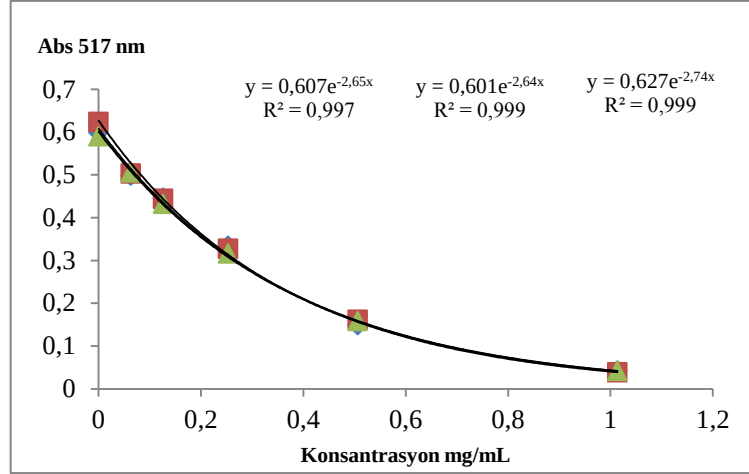
Şekil 31. Bitkinin Yaprak-Dal Kısımının Etanolik [MVS(y-d)e] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



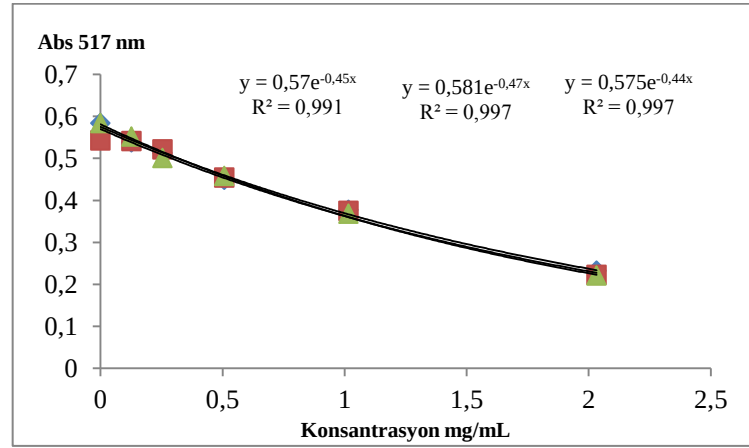
Şekil 32. Bitkinin Çiçek Kısımının Etanolik [MVS(ç)e] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



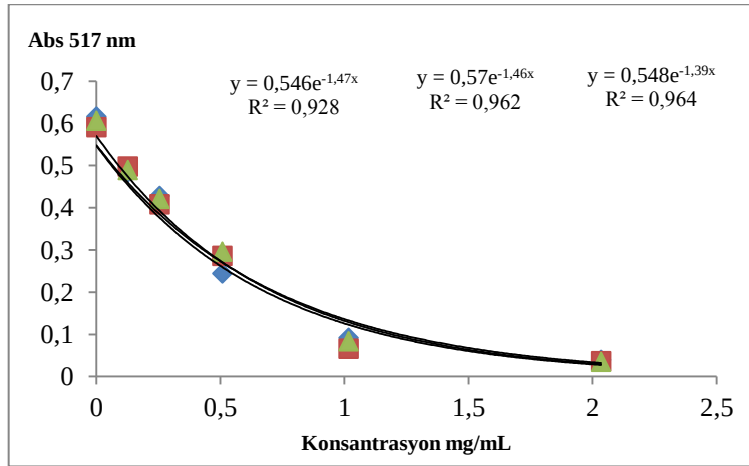
Şekil 33. Bitkinin Yaprak-Dal Kısımının Etanolik [TSB(y-d)e] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



Şekil 34. Bitkinin Çiçek Kısımının Etanolik [TSB(ç)e] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



Şekil 35. Bitkinin Yaprak-Dal Kısımının Etanolik [MVM(y-d)e] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği



Şekil 36. Bitkinin Çiçek Kısımının Etanolik [MVM(ç)e] Ekstraktının DPPH-SC₅₀ Grafiği

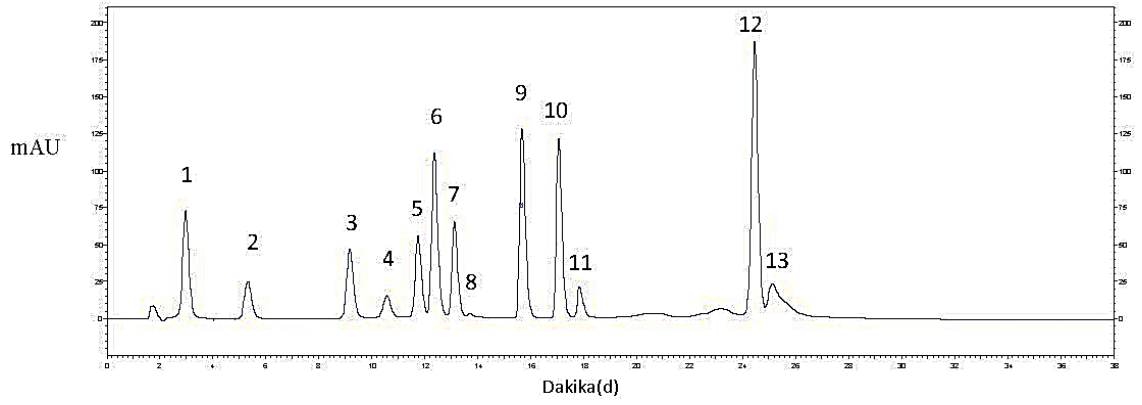
6.4. RP-HPLC-UV ile Fenolik Bileşenlerin Sonuçları ve Kromatogramları

13 fenolik bileşenle gerçekleştirilen örneklerin analizinde *Primula vulgaris*'de en çok bulunan bileşenler protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit ve rutindir. Şiringik asit, epikateşin ve luteolin ise hiçbir bitki örneğinde tespit edilemedi. Bitkilerin fenolik bileşen sonuçları Tablo 12'deki gibidir. MVS(ç) fenolik bileşimi zengin olup *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, *p*-kumarik asit ve rutin bakımından zengin bir bitki olarak tespit edildi.

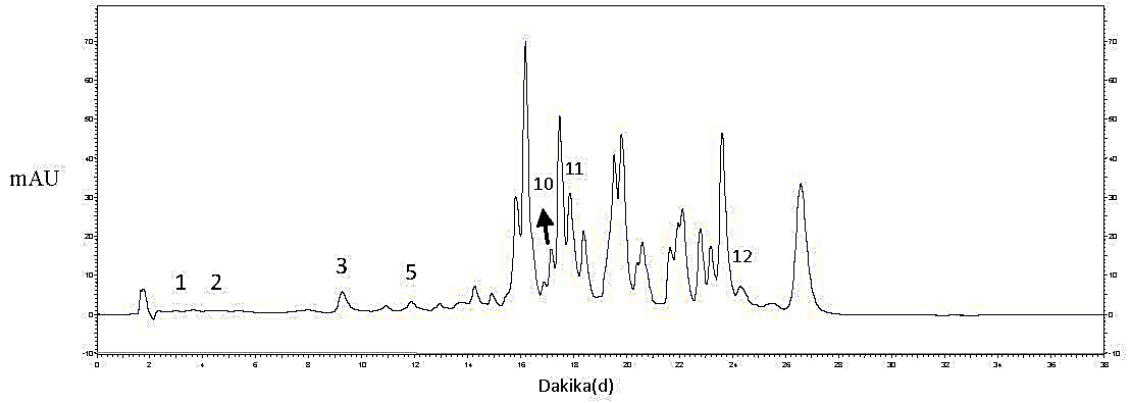
Tablo 12. RP-HPLC-UV ile Numunelerin Fenolik Bileşen Sonuçları

Standart (µg fenolik/g numune)	TSB(ç)e	TSB(y-d)e	ASM(y-d)e	ASM(ç)e	MVS(y-d)e	MVS(ç)e	MVM(y-d)e	MVM(ç)e
1. Gallik Asit	3.23±0.06	3,32±0,01	3,07±0,18	3,23±0,76	2,12±0,10	3,43±0,26	4,76±0,14	11,13±0,41
2.Protokatekuik Asit	30.71±0.03	17,41±0,04	17,19±1,42	20,49±1,80	18,20±1,60	25,11±2,30	17,89±0,41	20,16±0,01
3. <i>p</i> -OH benzoik Asit	76.56±0.17	56,74±1,67	46,76±1,93	52,94±0,90	45,22±0,78	57,87±0,75	45,32±0,12	63,17±1,59
4.Kateşin	53,97±1,31	T.E.	T.E.	T.E.	45,19±1,26	39,45±4,92	T.E.	T.E.
5.Vanilik Asit	65,01±0,10	37,99±0,42	33,44±1,51	T.E.	31,57±0,42	51,53±4,05	44,33±0,53	38,50±0,70
6.Kaffeik Asit	53,19±0,27	42,18±0,19	T.E.	T.E.	74,70±0,36	46,63±1,98	39,48±3,10	59,86±0,05
7.Şiringik Asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
8.Epikateşin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
9. <i>p</i> -Kumarik Asit	848,03±2,70	T.E.	T.E.	29,13±0,61	74,68±3,71	450,84±3,20	T.E.	T.E.
10.Ferulik Asit	T.E.	T.E.	31,50±1,86	13,84±1,20	T.E.	T.E.	36,05±9,50	42,77±1,57
11.Rutin	336,52±15,32	226,82±15,97	199,07±1,39	540,38±8,32	132,10±4,12	219,10±6,33	T.E.	102,19±5,66
12.t-sinamik Asit	T.E.	T.E.	15,63±4,26	12,20±0,09	33,57±0,25	13,91±0,11	85,88±18,67	21,87±0,60
13.Luteolin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.

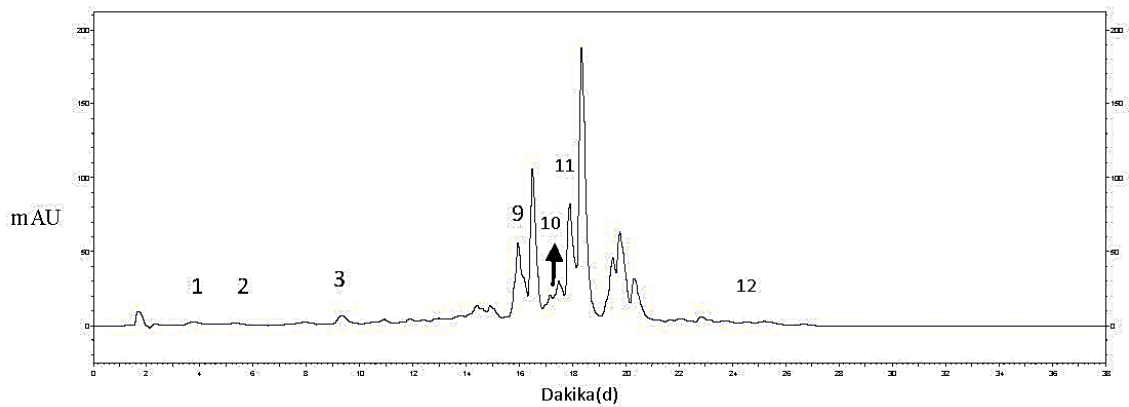
T.E:Tespit edilemedi.



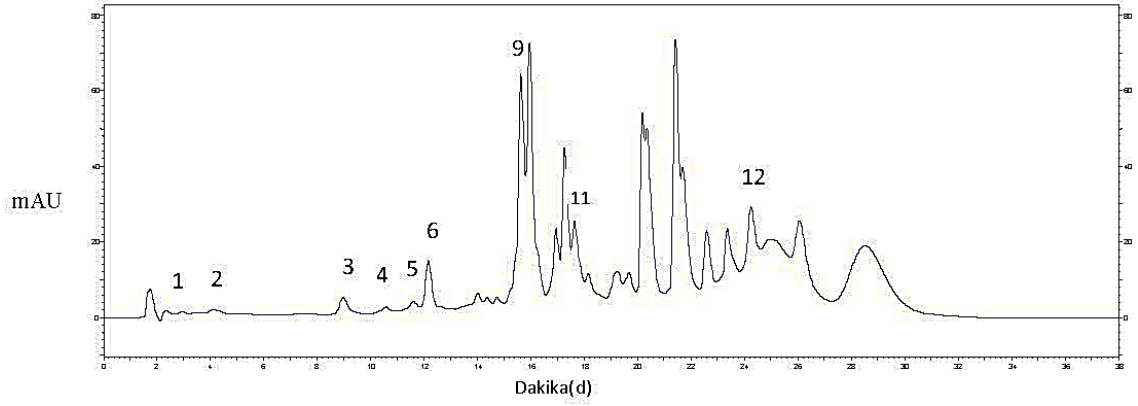
Şekil 37. HPLC-UV tarafından 280 nm'deki kromatogramı. (1) Gallik asit, (2) Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (4) Kateşin, (5) Vanilik asit, (6) Kaffeik asit, (7) Şiringik asit, (8) Epikateşin, (9) *p*-Kumarik asit, (10) Ferulik asit, (11) Rutin, (12) t-sinamik asit, (13) Luteolin



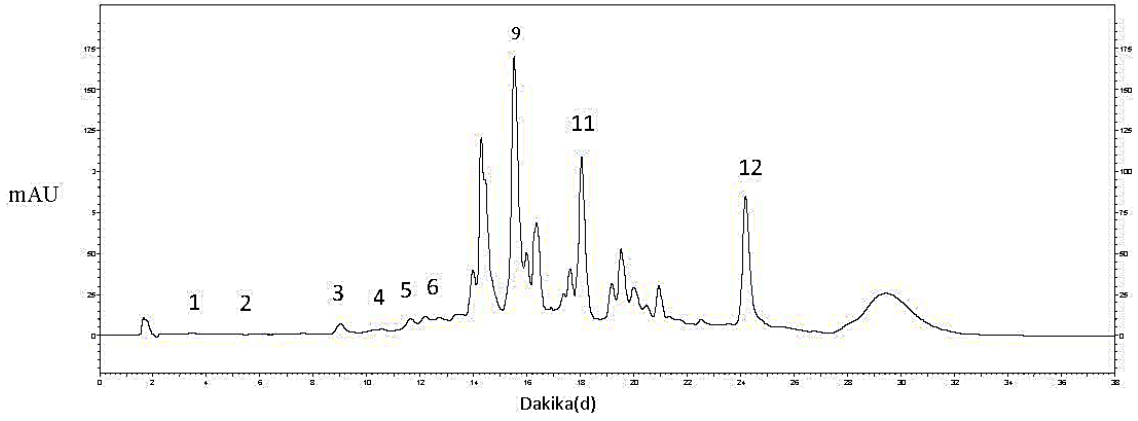
Şekil 38. ASM(y-d) kodlu numunenin kromatogramı. (1) Gallik asit, (2) Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (5) Vanilik asit, (10) Ferulik asit, (11) Rutin, (12) t-sinamik asit



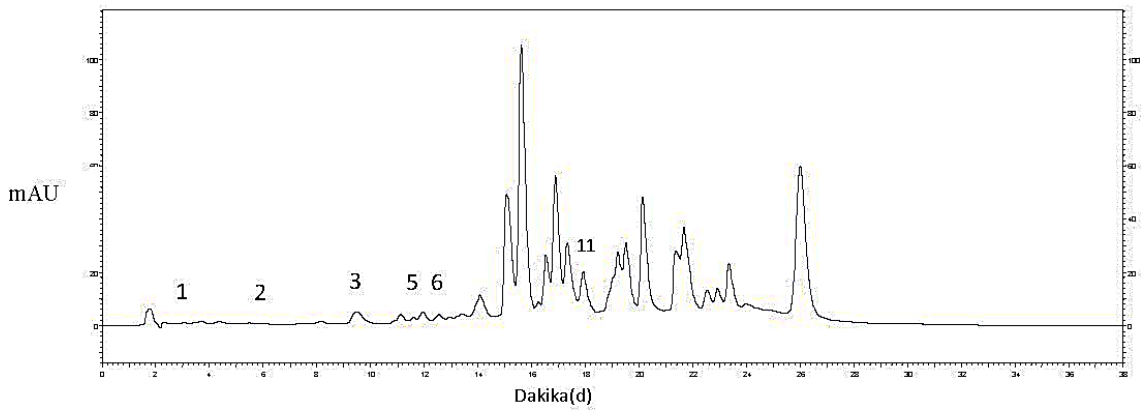
Şekil 39. ASM(ç) kodlu numunenin kromatogramı. (1) Gallik asit, (2) Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (9) *p*-Kumarik asit, (10) Ferulik asit, (11) Rutin, (12) t-sinamik asit



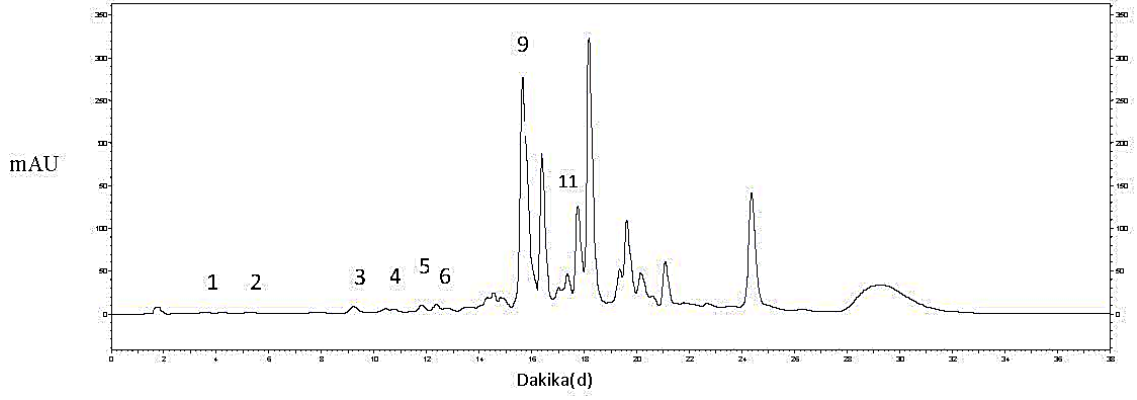
Şekil 40. MVS(y-d)e kodlu numunenin kromatogramı. (1) Gallik asit, (2)Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (4) Kateşin, (5) Vanilik asit, (6) Kaffeik asit, (9) *p*-Kumarik asit, (11) Rutin, (12) t-sinnamik asit



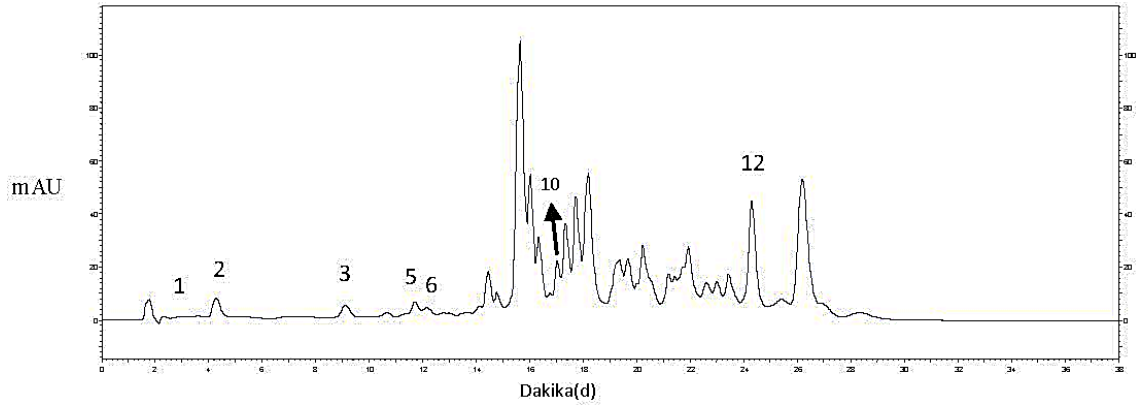
Şekil 41. MVS(ç)e kodlu numunenin kromatogramı. (1) Gallik asit, (2)Protokatekuik asit, (3) *p*-OH enzoik asit, (4) Kateşin, (5) Vanilik asit, (6) Kaffeik asit, (9) *p*-Kumarik asit, (11) Rutin, (12) t-sinnamik asit



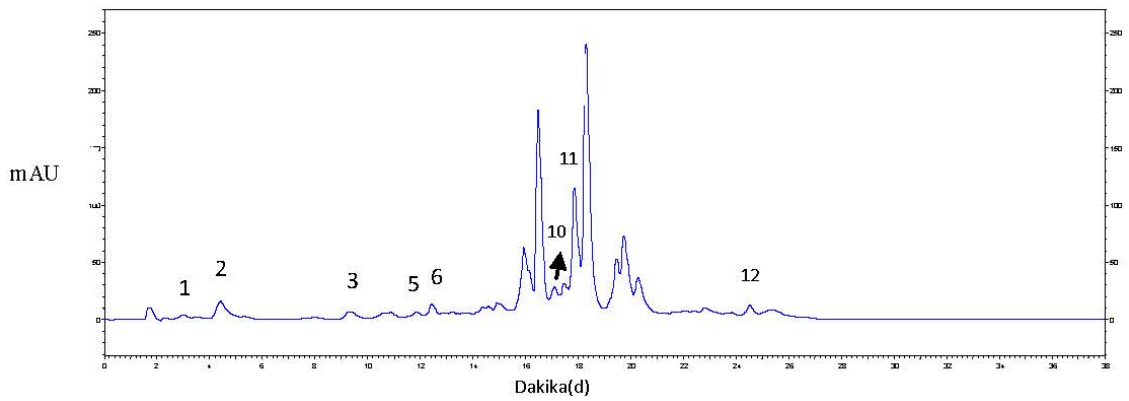
Şekil 42. TSB(y-d)e kodlu numunenin kromatogramı. (1) Gallik asit, (2)Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik ait, (5) Vanilik asit, (6) Kaffeik asit, (11) Rutin



Şekil 43. TSB(ç)e kodlu numunenin kromatogramı. (1) Gallik asit, (2)Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (4) Kateşin, (5) Vanilik asit, (6) Kaffeik asit, (9) *p*-Kumarik asit, (11) Rutin



Şekil 44. MVM(y-d)e kodlu numunenin kromatogramı. (1) Gallik asit, (2)Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (5) Vanilik asit, (6) Kaffeik asit, (10) Ferulik asit, (12) t-sinamik asit



Şekil 45. MVM(ç)e kodlu numunenin kromatogramı. (1) Gallik asit, (2)Protokatekuik asit, (3) *p*-OH benzoik asit, (5) Vanilik asit, (6) Kaffeik asit, (10) Ferulik asit, (11) Rutin, (12) t-sinamik asit

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye farklı iklimlere, coğrafik konuma, ekolojik faktörlere sahip olmasından dolayı biyolojik kaynakları bakımından en zengin ülkelerden biridir. Bu denli zengin çeşitliliğe sahip ülkemizde bitkilerin çoğu zengin polifenol ve flavonoid içeriğine ve her bitki türü de tipik fenolik profile sahiptir. Polifenolik bileşiklerin konsantrasyonu ve tipi bitkinin floral orjiniyle alakalı olup, antioksidan, antimikrobiyal, antiviral ve antikanser aktiviteleri gibi birçok aktivitelerden sorumlu ana faktörlerdir. Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi belirlemek için *Primula vulgaris* bitkisinin etanolik ve sulu ekstraktları hazırlanarak spektrofotometrik *in vitro* antioksidan analizleri için Toplam Polifenol, FRAP, DPPH radikal temizleme aktivite testleri uygulandı.

Primula vulgaris bitkisinin çiçek ve yaprak-dal kısımlarından elde edilen iki farklı polariteye sahip ekstraktın toplam antioksidan kapasitesi Troloks eşdeğeri cinsinden (Troloks eşdeğeri antioksidan güç) FRAP yöntemine göre hesaplandı. Fe^{+3} iyonlarının indirgenmesi esasına dayanan FRAP testine göre ekstraktlar 15.93-223.11 μ mol Troloks/g numune arasında değişim göstermektedir. En yüksek değer Maçka yöresinden toplanan bitkinin çiçek kısmının etanolik ekstraktında, en düşük değer Akçaabat yöresinden toplanan bitkinin yaprak-dal kısmının etanolik ekstraktında tespit edildi. Dolayısıyla en yüksek FRAP aktivitesi Akçaabat bölgesinden toplanan bitkinin çiçek kısmının sulu ekstraktında bulundu. Bu bize antioksidan aktiviteden sorumlu ajanların fenolik maddelerden ileri geldiğini fakat ekstrakt içerisinde bu yöntemi kullanarak hangi fenolik yapıların olduğunu göstermez.

Folin-Ciocalteu yöntemi, ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarını gösteren bir testtir. Çalışmamızda toplam fenolik madde miktarları en düşük değer Maçka yöresi 2.266 mg GAE/ g numune, en yüksek fenolik madde Bostancı bölgesi 20.893 mg GAE/ g numune olarak tespit edildi.

Çalışmamızda Akçaabat, Bostancı, Maçka mor ve sarı renkli bitkilerin çiçek kısımlarının sulu ekstraktları karşılaştırıldığında FRAP ($p<0.016$) ve DPPH ($p<0.025$) parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken toplam fenolik madde ($p<0.376$) için anlamlı farklılık bulunmadı. Akçaabat, Bostancı, Maçka mor ve sarı renkli bitkilerin çiçek kısımlarının etanolik ekstraktları karşılaştırıldığında toplam fenolik madde ($p<0.019$), FRAP ($p<0.016$) ve DPPH ($p<0.016$) parametreleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Akçaabat, Bostancı, Maçka mor ve sarı renkli bitkilerin yaprak-dal kısımlarının etanolik ekstraktları karşılaştırıldığında toplam fenolik madde ($p<0.015$), FRAP ($p<0.022$) ve DPPH ($p<0.022$) parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Akçaabat, Bostancı, Maçka mor ve sarı renkli bitkilerin yaprak-dal kısımlarının sulu ekstraktları karşılaştırıldığında toplam fenolik madde ($p<0.053$), FRAP ($p<0.015$) ve DPPH ($p<0.114$) parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.

Literatürlerde doğal ürünlerin fenolik madde miktarları ile toplam antioksidan kapasiteleri arasında $R^2=0,6-1,0$ arasında değişen pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (83,57,84).

Bostancı'dan ve Akçaabat'tan toplanan bitkinin çiçek kısmının etanolik ekstratında ve Bostancıdan toplanan bitkinin çiçek ve yaprak-dal kısmının sulu ekstratında DPPH ile FRAP parametreleri arasında anlamlı negatif korelasyon bulundu ($p<0.05$). Maçkadan toplanan sarı ve mor renkli bitkinin çiçek kısmının etanolik ekstratında toplam fenolik madde ile DPPH parametreleri arasında anlamlı negatif korelasyon bulundu ($p<0.05$).

Maçka'dan toplanan mor renkli bitkinin yaprak-dal kısmının sulu ekstratında toplam fenolik madde ile FRAP parametreleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0.05$). Maçkadan toplanan sarı renkli bitkinin yaprak-dal kısmının sulu ekstratında toplam fenolik madde ile DPPH parametreleri arasında anlamlı negatif korelasyon bulundu ($p<0.05$).

Etanolik ve sulu ekstraksiyonlar ile hazırlanan *Primula vulgaris* ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları Folin- Ciocalteu yöntemine göre galik asit standardı kullanılarak tayin edildi. Bostancı bölgesinden toplanan bitkinin çiçek kısmında 20.893 mg GAE/g, Maçka bölgesinden toplanan sarı renkli bitkinin çiçek kısmında 12.810 mg GAE/g arasında değişen konsantrasyonlarda toplam fenolik madde miktarları bulundu. Fenolik asitler ve polifenoller bol miktarda hidroksil grubu içeren polar bileşiklerdir ve bu nedenle de polar çözücülerde iyi çözünürler. Etanol polaritesi sudan daha düşük olmasına rağmen organik moleküller için çok iyi bir çözücüdür. Polar molekülleri çözebildiği gibi az da olsa düşük polariteli molekülleri de sudan daha iyi çözmektedir. Ancak toksik olduğundan dolayı gıda endüstrisinde kullanılmamaktadır. Fakat bilimsel

araştırmalarda antioksidan kapasitenin belirlenmesinde en çok kullanılan ekstraksiyon çözücülerinden birisidir. Jaberian et al. (2012) de yaptıkları çalışmada *P. auriculata*, *F. vaillantii*'nin toplam fenolik madde miktarını 6.54 mg GAE/g (*F. vaillantii*) - 11.32 mg GAE/g (*P. auriculata*) olarak değiştiği bildirilmektedir. Bu bildirilen miktarlar bizim Bostancı yöresinden toplanan *Primula vulgaris* bitkisinin çiçek kısmının etanolik fraksiyonunda bulduğumuz toplam fenolik madde miktarından daha düşük konsantrasyondadır.

Çeşitli doğal ürünlerden bitkiler, bal, polen, propolis gibi örnekler içerdikleri fenolik yapıya sahip sekonder metabolit ajanların konsantrasyonları çeşitli çevre şartlarından ve buna bağlı olarak metabolik ihtiyaçlarının değişik olmasından dolayı farklılıklar göstermektedirler. Örneğin, Mersin yöresinden toplanan *Primula vulgaris* bitkisinin sulu ve etanolik ekstraktlarında, toplam fenolik madde miktarı 89.6 ve 122.8 µg GAE/mg değerine sahip olduğu belirtilmiştir (85). Bu bildirilen miktarlar bizim Bostancı yöresinden toplanan *Primula vulgaris* bitkisinin çiçek kısmının etanolik fraksiyonunda bulduğumuz toplam fenolik madde miktarından daha yüksek konsantrasyondadır.

Ayrı ayrı fenolik maddeleri belirlemek için saf fenolik madde standartları kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin yapmak gerekir, ya da gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GS-MS) kullanılarak bu polar bileşiklerin tanımlanmaları mümkün olmaktadır. Çalışmada *Primula vulgaris*'in etanolik ekstraktlarında var olan fenolik bileşikleri belirlemek maksadıyla 13 ayrı saf fenolik standart kullanılarak HPLC- DAD ile ayırma ve tanımlamalar yapıldı. Ters faz (RP)- HPLC ile C₁₈ kolon kullanılarak ve dedeksiyon fotodiyot (DAD) dedektör kullanılarak değişik UV bölgerinde fenolik bileşenler belirlendi. Bu amaçla; gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, kateşin, vanilik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, *t*-sinnamik asit ve luteolin standartları kullanılarak tayinler yapıldı. Bunun için önce her bir standart için ışığı absorbaladıkları maksimum dalga boyları ve alıkonma zamanları hesaplandı ve sonra tüm karışım halinde HPLC'de standart kromatogram elde edildi. Bu fenolik bileşenlerin kromatografik ayrılmalarında 150 mm veya 250 mm uzunluk, 4 mm veya 4,6 mm iç çap ve 5 µm partikül büyüklüğüne sahip ters faz C₁₈ kolonları literatürde en sık karşılaşılan

kolon tipleridir (86,87,88). Bu çalışmada literatürle uyumlu şekilde ters faz C₁₈ (150 mm × 4,6 mm i.d., 5µm) kolonu kullanıldı.

Çalışmada 13 adet fenolik bileşen standardı kullanıldı. Akçaabat, Maçka ve Bostancı bölgesinden toplanan *Primula vulgaris* bitkisinin çiçek ve yaprak-dal kısımları olan 8 adet numunemizin hepsinde protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, gallik asit, vanilik asit ve rutin değişen konsanstrasyonlarda tesbit edildi. Şiringik asit, epikateşin ve luteolin ise hiçbir bitki örneğinde tespit edilemedi.

Maçka bölgesinden toplanan sarı renkli *Primula vulgaris*'in çiçek kısmının fenolik bileşimi zengin olup *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, *p*-kumarik asit ve rutin bakımından zengin bir bitki olarak tespit edildi. Özellikle kateşin ve *p*-kumarik asit Maçka bölgesinden toplanan sarı renkli bitkinin hem çiçek hem de yaprak-dal kısmında temel fenolik bileşenleri olarak bulundu. Ayrıca *p*-kumarik asit, Bostancı bölgesinden toplanan bitkinin çiçek kısmında yüksek konsantrasyonda tespit edildi. Jaberian vd. (2012)'de yaptıkları çalışmada bir *vulgaris* türü olan *Falcaria vulgaris*'in carvacrol ve fumarik asit bakımından zengin olduğu bildirilmektedir.

DPPH radikali temizleme testi, çeşitli doğal ürünlerin serbest radikal temizleme yeteneğinin ölçülmesinde sık kullanılan bir metottur (89,90,91). DPPH ticari olarak satın alınan bir radikal olup bir elektron veya hidrojen aldığında 517 nm'de maksimum absorbands verir (58). DPPH radikalının % 50'sinin oluşumunu engelleyen madde miktarı SC₅₀ olarak tanımlanır ve düşük SC₅₀ değeri yüksek radikal temizleme aktivitesini gösterir.

Çalışılan iki farklı polaritedeki *Primula vulgaris* ekstraktlarının DPPH radikal temizleme aktiviteleri en yüksek Bostancı yöresine ait bitkinin çiçek kısmının sulu fraksiyonunda (SC₅₀: 0.282 mg/mL), en düşük Maçka yöresine ait sarı renkli bitkinin çiçek kısmının sulu fraksiyonda (SC₅₀: 1.391 mg/mL) olarak bulundu. Etanolik ekstraktlara bakıldığında *Primula vulgaris* bitkisinin DPPH radikal temizleme aktiviteleri en yüksek Maçka yöresine ait sarı renkli bitkinin çiçek kısmında (SC₅₀: 0.469 mg/mL), en düşük Bostancı yöresine ait bitkinin yaprak-dal kısmında (SC₅₀: 2.153 mg/mL) olarak bulundu. Kısacası bitki ekstraktlarının her birinin DPPH radikaline karşı etkili olduğu ve 0.256 ile 7.858 mg/mL arasında SC₅₀ değerlerine sahip oldukları bulundu. Sonuçlara göre en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip Bostancı

yöresine ait TSB(ç)_e, en düşük temizleme aktivitesine sahip ise Akçabaat yöresine ait ASM(y-d)_e numunesi olarak bulundu.

Bitkilerde çok farklı yapıda antioksidan bileşikler mevcuttur ve her bir antioksidan bileşeni ayrıca ölçmek çok zordur. Bu nedenle her özütün antioksidan potansiyelini değerlendirmek için birkaç farklı test kullanmak daha yararlı ve bilgilendirici olabilir (92,56,58,93). Bu çalışmada başlıca üç metotile *Primula vulgaris*'in antioksidan kapasitesi belirlenmeye çalışıldı; toplam fenolik madde tayini, demir (III) indirgeme antioksidan kuvveti (FRAP) tayini ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi tayini.

Günümüzde bitkisel özütlerin toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan toplam fenolik madde miktarı (TFM) ve demir (III) indirgeme gücü (FRAP) yöntemleri literatürde kabul görmüşen geçerli testlerdendir. Bir redoks reaksiyonu olan FRAP olarak adlandırılan test, biyolojik materyallerin toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. İndirgeme kuvveti örnekte bulunan bütün bileşiklerin indirgeme potansiyellerinin toplamını oluşturur ve bulunan yüksek FRAP değeri yüksek Fe⁺³ indirgeme kuvvetini göstermektedir.

Sonuç olarak Akçabaat, Maçka ve Bostancı yörelerinden toplanan *Primula vulgaris* fenolik bileşiklerden zengin bir doğal ürün olup, yapısında bulunan protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, gallik asit, vanilik asit ve rutince zengin antioksidan yapılarından dolayı biyolojik değeri yüksek bir üründür. Karadeniz bölgesi *Primula vulgaris* dikimi ve üretimi için çok elverişli bir bölge olması nedeniyle bu değerli ürünün gıda sanayiinde daha yaygın biçimde kullanılması koruyucu tıp açısından yararlı olacaktır.

8. ÖNERİLER

1. Çalışmamızda 3 antioksidan testten başka literatürlerde sık kullanılan diğer antioksidan testler de çalışılsaydı daha detaylı inceleme olurdu.
2. Antioksidan parametrelerin yanında antimikrobiyal aktivite de incelenmiş olsaydı *Primula vulgaris*'in biyolojik etkinliği daha belirgin olarak ortaya çıkmış olurdu.
3. Bu çalışmanın devamında izolasyon çalışmaları yapıp biyolojik aktif bileşikler belirlenme yoluna gidilebilir. Sonrasında bu aktif bileşiklerin etkinliği deney hayvanlarında *in vivo* deneylerle incelenebilir.
4. Fibroblast hücre serilerinde t-BHP (t-bütil hidroperoksit) ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisi comet assay yöntemi ile araştırılabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Cotton CM (1999). Ethnobotany, Principles and Applications, John Wiley and Sons, England.
2. Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N (2000). “Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı”, Ankara, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van 100.Yıl Üniversitesi.
3. Davis PH (1965-1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 1–9, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
4. Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer HC (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.11, Edinburgh Univ. Pres. Edinburgh.
5. Zeybek N, Zeybek U (1994). Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 2, 216-217.
6. Mizuhiro M, Ito K, Mii M (2001). Production and Characterization of Interspecific Somatic Hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*, Plant Science, 161: 489-496.
7. Mast AR, Kelso S, Richards J, Lang DJ, Feller DMS, Conti E (2001). Phylogenetic Relationships in *Primula* L. and Related Genera (Primulaceae) Based on Noncoding Chloroplast DNA, Int. Journal Plant Science, 162, (6), 1381-1400.
8. Richards J (1997). *Primula*. Timber Press. Portland. Sang T, Crawford DJ & Stuessy TF, Chloroplast DNA Phylogeny, Reticulate Evolution, and Biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae), American Journal Botany, 84, 1120-1136.
9. Lamond J (1978). In Edit. by Davis P. H., Flora of Turkey and The East Aegean, Islands, 6, 112-120.
10. Baytop T (1999). Therapy with Medicinal Plants in Turkey, University of Istanbul, Istanbul, p. 273.
11. Prajapati DN, Knox JF, Emmons J, Saeian K, Csuka ME, Binion DG (2003). Leflunomide Treatment of Crohn's Disease Patients Intolerant to Standard Immunomodulator Therapy, J Clin Gastroenterol, 37, (2), 125-133.

12. Davis PH (1978). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 6, Edinburg Univ. Press, Edinburg, 111-118.
13. Koçyigit M (2005). Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Özhatay N, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
14. Başer KHC (2001). Her derde deva bir bitki Kekik. Bilim Ve Teknik, Mayıs: 74–77.
15. Kandemir A, Beyazoglu O (2002). Köse Dağları'nın (Gümüşhane) Tıbbi ve Ekonomik Bitkileri. S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6-3: 148-157.
16. Ertug F (2004). Wild edible plants of the Bodrum Area (Mugla, Turkey). Turk J Bot., 28: 161-174.
17. Şimşek I, Aytekin F, Yeşilada E, Yıldırım S (2004). An Ethnobotanical Survey of The Beypazarı, Ayas and Gudul District towns of Ankara Province (Turkey). Economic Botany 58: 705–720.
18. Delibaş N, Özçankaya R (1995). Serbest radikaller. SDÜ Tıp Fak. Derg., 2(3): 11-17.
19. Kolaylı S, Kucuk M, Duran C, Candan F, Dinçer B (2003). Chemical and Antioksidant Properties of Laurocerasus Officinalis Roem, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 7489-7494.
20. Sies H (1991). Oxidative Stres, From Basic Research to Clinical Application, American Journal Medic, 31-37.
21. Dündar Y, Aslan R (2000). Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar, I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
22. Winston GW (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. Comp. biochem. Physiol. 100C: 173-176.
23. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases, Clin. Biochem, 32: 595-603.

24. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CM (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? , J Lab. Clin Med, 119: 598-620.
25. Fridovich I (1975). Superoxide Dismutases, Annu. Rev. Biochem., 44: 147-159.
26. Kahkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3954-3962.
27. Cao G, Prior RL (1999). In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radical Biology and Medicine, 27: 1173-1181.
28. Kaur C, Kapoor HC (2001). Antioxidants in fruits and vegetables—the Millennium's health. International Journal of Food Science and Technology, 36: 703–725.
29. Güçlü K, Apak R, Özyürek M (2009). Hidroksil ve Süperoksit Radikallerinin Süpürülmesine Dayalı Yeni Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi. Tübitak Proje, pp. 1-114.
30. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2: 152-159.
31. Shahidi F (1996). Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. AOCS Press, Champaign- Illinois 1-11. AOCS Press, Champaign-Illinois, pp. 209, USA.
32. Meister A, Anderson ME (1983). Glutathion, Annu. Rev. Biochem 52, 711-60.
33. Shi H, Noguchi N, Niki E (2001). Introducing Natural Antioxidants. In J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), Antioxidants in food. CRC Press, USA.
34. Maslarova NVY (2001). Inhibiting Oxidation. In J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), Antioxidants in food. CRC Press, USA.
35. Abuja PM, Murkovic M, Werner P (1998). Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. J. Agric. Food Chem. 46(10): 4091-4096.

36. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H (1991). Antioxidant defense system: The role of carotenoids, tocopherols and thiols. *AM. J. Clin. Nutr.* 53: 194S-200S.
37. Keskin H, Erkmen G (1987). “Besin Kimyası”, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
38. Güçlü K, Sözgen K, Tütem E, Özyürek M, Apak R (2005). Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical, *Talanta*, 65: 1226-1232.
39. Gregory JF (1996). Vitamins. In “Food Chemistry”, O.R.Fennema (Ed). Chapter 8. Pp: 531-616. University of Wisconsin-Madison. Marcel Dekker Inc. New York.
40. Kondo H, Takahashi M, Niki E (1997). Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants, *FEBS Letters*, 413: 236-238.
41. Heijnen CGM, Haenen GRMM, Wiseman SA, Tijburg LBM, Bast A (2000). The interaction of tea flavonoids with the NO-system: Discrimination between good and bad NO, *Food Chem* 70: 365-370.
42. Awad MA, Jager AD (2003). Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples and other fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 27: 53–58.
43. Covas MI (2007). Olive oil and cardiovascular system. *Health Pharmacology Research*, 55: 175–186.
44. Alasalvar C, Shahidi F, Liyanapathirana CM, Ohshima T (2003). Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellane L.*) : 1. Compositional Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3790-3796.
45. Chung KT, Wong TY, Huang YW, Lin Y (1998). Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38: 421–464.
46. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1044-62.

47. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56: 200-207.
48. Cai W, Chen X (2006). Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin $\alpha v \beta 3$ antagonism. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 6: 407–28.
49. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 933-956.
50. Cao G, Sofic E, Prior RL (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure–activity relationships. *Free Radical Biol. Med.* 22: 749–760.
51. Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 285–294.
52. Pietta PG (2000). Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.* 63: 1035-1042.
53. Erkoç Ş, Erkoç F, Keskin N (2003). Theoretical Investigation of Quercetin and Its Radical Isomers, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 631: 141-146.
54. Cuyckens F, Claeys M (2004). Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids, *J. Mass Spectrom.* 39: 1-15.
55. Becchi M, Fraisse D (1989). Fast Atom Bombardment and Fast Atom Bombardment Collision-Activated Dissociation/Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Analysis of C-Glycosidic Flavonoids, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18: 122-130.
56. Beratta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM (2005). Standardization of Antioxidant Properties of Honey by A Combination of Spectrophotometric/Fluorimetric Assay and Chemometrics, *Anal. Chim. Acta*, 533: 185-191.
57. Küçük M, Kolaylı S, Karaoglu Ş, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F (2007). Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types from Anatolia, *Food Chem.* 100: 526-534.

58. Huang D, Ou B, Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 53: 1841–1856.
59. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE (2004). A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970–7981.
60. Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* 28: 49-55.
61. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84: 407–412.
62. Benzie IFF, Strain JJ (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
63. Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linssen PH (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, *J. Sci. Food Agric.* 77: 140-146.
64. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80: 1144-1152.
65. Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
66. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.

67. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, et al. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3273 – 3279.
68. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23(12): 1719-1726.
69. Benzie IFF, Strain JJ (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299: 15–27.
70. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA (1998). *Principles of instrumental analysis*, 5th ed. Brooks Cole.
71. Ulusoy E, (2010). Anzer Balı Ve Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi Ve Antioksidan Özellikleri. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
72. Erdik E, Obalı M, Yüksekışık N, Öktemer A, Pekel T, İhsanoğlu E (2000). “Denel Organik Kimya”, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara, 133-136.
73. Tomruk E (2005). Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Hidrofilik Destek Materyal Sentez ve Kromatografik Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
74. Sarıkaya AO, Ulusoy E, Öztürk N, Tuncel M, Kolaylı S (2009). Antioxidant Activity and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (*Castania Sativa* Mill.) Honey and Propolis, *Journal of Food Biochemistry*, 33(4): 470-481.
75. Akyüz E (2011). *Digitalis ferruginea* ssp. *Schischkinii* ve Bazı Endemik *Digitalis* Türlerinin Ekstraktlarında Mevcut Kardiyak Glikozitleri ve Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Belirlenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

76. Dursun İ (2011). *Butomus umbellatus* L. ve *Sparganium emersum* Rehmann Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Tayini ve Fenolik Asit İçeriklerinin HPLC-UV ile Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
77. Lindsay S (1987). *HPLC Analytical Chemistry by Open Learning*, 4th ed., New York: John Wiley & Sons., 54-72.
78. Skoog DA, Holler FH, Crouch SR (2007). *Principles of Instrumental Analysis*, Thompson Brooks, California, USA, 17-21.
79. Harvey D (2000). *Modern Analytical Chemistry*, Mc Graw Hill International Edition, USA.
80. Yıldız A, Genç Ö (1993). *Enstrümenal Analiz*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, ISBN: 975-491-028-6, 421-438.
81. Kenmore CK, Erskine SR, Bornhop DJ (1997). Refractive-index detection by interferometric backscatter in packedcapillary high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 762: 219-225.
82. De Villiers A, Lynen F, Crouch A, Sandra P (2004). Development of A Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine, *Chromatographia*, 59: 403–409.
83. Al-Mamary M, Al-Meerı A, Al-Haborı M (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Res.* 22: 1041–1047.
84. Kolaylı S, Aliyazıcıoğlu R, Ulusoy E, Karaoğlu Ş (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of selected Turkish honeys, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 36, pp. 163-172.
85. Demir N, Gungor AA, Nadaroglu H, Demir Y (2014). The antioxidant and radical scavenging activities of Primrose. *European Journal of Experimental Biology*, 4(2):395-401.

86. Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzynska K (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, 1187: 18–24.
87. Šarić ĆLj, Čabarkapa SI, Beljkaš MB, Mišan ČA, Sakač BM, Plavšić VD (2009). Antimicrobial activity of plant extracts from Serbia. *Food Processing, Quality & Sa-fety*, 36 (1-2), 1-6.
88. Truchado P, Ferreres F and Tomas-Barberan F (2009). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. *J. Chromatogr A* 1216: 7241-7248.
89. Hatano T, Takagi M, Ito H and Yoshida T (1997). Phenolic constituents of liquorice. VII. A new calcone with a potent radical scavenging activity and accompanying phenolics. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45: 1485 – 1492.
90. Ahn MR, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China, *Food Chem.* 101: 1383-1392.
91. Nagai T, Reiji I, Hachiro I, Nobutaka S (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem* 80: 29–33.
92. Tsai PJ, McIntosh J, Pearce P, Camden B, Jordan BR (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Res. Int.* 35: 351-356.
93. Zalibera M, Staško A, Šlebodov A, Jančovičová V, Čermáková T, Brezová V (2008). Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys-An electron paramagnetic resonance study. *Food Chem.* 110: 512-521.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : ÖZKAN, Mehtap Tuğçe
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : 22.11.1988, Mersin
Medeni hali : Bekar
E-Posta : mtugceozkan@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniv. SABE Eczacılık Fak. Biyokimya AbD.	
Lisan	Celal Bayar Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Mersin 19 Mayıs Süper Lisesi	2006

YABANCI DİL

İngilizce

HOBİLER

Yüzme, buz pateni, kitap okuma.