

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN *PRUNELLA* L. TÜRLERİNİN  
FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTIOKSİDAN  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİNDE ANALİTİK  
METOTLAR**

**Saliha ŞAHİN**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN *PRUNELLA* L. TÜRLERİNİN  
FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTiOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİNDE ANALİTİK METOTLAR**

**Saliha ŞAHİN**

Prof. Dr. Cevdet DEMİR  
(Danışman)

DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2011  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Saliha ŞAHİN tarafından hazırlanan “Türkiye’de Yetişen *Prunella* L. Türlerinin Fenolik Bileşikleri ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesinde Analitik Metotlar” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Cevdet DEMİR

**Başkan** : Prof. Dr. Cevdet DEMİR  
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Şeref GÜÇER  
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Hulusi MALYER  
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Adnan ÖZCAN  
Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Belgin İZGİ  
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Kadri ARSLAN**

**Enstitü Müdürü**

...../...../ 2011

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**31/05/ 2011**

**Saliha ŞAHİN**

## ÖZET

Doktora Tezi

### TÜRKİYE'DE YETİŞEN *PRUNELLA* L. TÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİNDE ANALİTİK METOTLAR

**Saliha ŞAHİN**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Cevdet DEMİR

Bu tez kapsamında, Türkiye’de yayılışı saptanan *Lamiaceae* familyasına ait *Prunella* L. türleri (*Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella grandiflora* L., *Prunella orientalis* Bornm.) için örnek hazırlama teknikleri geliştirilmiş ve örneklerde bulunan fenolik maddeler, kantitatif olarak HPLC-DAD (yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör) ile belirlenmiştir. Bununla birlikte HPLC-DAD ile belirlenemeyen *Prunella* L. türlerinde bulunabilecek muhtemel fenolik maddeler LC-MS (sıvı kromatografi-kütle spektrometri) ile kalitatif olarak belirlenmiştir. Ayrıca hazırlanan dört bitki örneğinin tarafımızdan geliştirilen immobilize enzim yöntemle toplam fenol tayinleri yapılmış, bulunan toplam fenol değerleri Folin ve serbest enzim yöntemleri ile bulunan değerlerle karşılaştırılmıştır. Bitki örneklerinin toplam antioksidan aktivite tayinleri ABTS [2,2’-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] ve DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) yöntemleri ile yapılmıştır. Çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden PCR (temel bileşen regresyon analizi) ve PLS (kısmı en küçük kareler regresyonu) ile bitki örneklerinin toplam fenol tayinleri, PLS ve OSC-PLS (ortagonal sinyal düzeltmesi- kısmı en küçük kareler regresyonu) ile toplam antioksidan aktivite tayinleri başarılı bir şekilde yapılmıştır. Kemometrik yöntemler ile toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite hesaplamaları yapılmadan önce verilere; optimize korelasyon düzeltmesi (COW), merkezileştirme, sinyal düzeltme ve normalizasyon gibi işlemler uygulanmıştır. Tahmini toplam fenol değerleri Folin yöntemi ile bulunan toplam fenol değerleriyle, tahmini toplam antioksidan aktivite değerleri de ABTS/DPPH yöntemi ile bulunan toplam antioksidan aktivite değerleri karşılaştırılmıştır. Tahmini toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değerlerinin gerçek değerlerle uyumlu olduğu bulunmuştur. Toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değeri yüksek olan metanol ekstraktlarının izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen fraksiyon ve ekstraktların toplam fenol, toplam antioksidan aktivite tayinleri ve HPLC-DAD analizleri yapılmıştır. İzolasyon çalışmaları sonucunda *Prunella* L. türlerinden yüksek miktarda rutin, rosmarinik asit ve kafeik asit izole edilmiştir. Çalışmalarımız, bitkilerdeki antikanser özelliklerinin araştırılması çalışmalarının ilk basamağını oluşturduğu için gelecekte yapılacak çalışmalara kaynak olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** *Lamiaceae*, *Prunella* L., HPLC, toplam fenol, toplam antioksidan aktivite, immobilize enzim yöntemi, çok değişkenli kalibrasyon, izolasyon.

**2011, 139 + xiv sayfa**

## ABSTRACT

### PhD Thesis

#### THE EVALUATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *PRUNELLA* L. SPECIES GROWN IN TURKEY BY ANALYTICAL METHODS

**Saliha ŞAHİN**

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

**Supervisor:** Prof. Dr. Cevdet DEMİR

In this thesis, a sample preparation technique for extraction of *Prunella* L. species grown in Turkey (*Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella grandiflora* L., *Prunella orientalis* Bornm.) belonging to *Lamiaceae* family was developed and the contents of phenolic compounds in *Prunella* L. were identified by HPLC-DAD (high performance liquid chromatography-diode array detector). The phenolic compounds not determined by HPLC-DAD were qualitatively determined by LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry). A new immobilized enzymatic method for determination of total phenolic content of four *Prunella* L. species was developed. The results were compared with those obtained by applying the Folin and the free enzymatic methods. Total antioxidant activities of *Prunella* L. were determined by ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) methods. Multivariate calibration models relating the chromatographic profiles with total phenolic content and total antioxidant activity of *Prunella* L. extracts were constructed. Correlation optimized warping (COW), smoothing, normalization, and column centering was employed to analytical signals. The results demonstrated that the developed PCR (principal component regression) and PLS (partial least squares regression) multivariate calibration models can successfully predict the total phenolic content of *Prunella* L. samples. Also the results demonstrated that the developed PLS and OSC-PLS (orthogonal signal correction-partial least squares regression) multivariate calibration models can successfully predict the total antioxidant activity of *Prunella* L. samples. The methanol extracts of *Prunella* L. species exhibited strong antioxidant properties. Therefore, the phenolic compounds extracted using methanol were isolated by a lab-scale isolation system. These extracts were further purified using Sephadex LH-20 column chromatography, resulting in fractions. Total phenol contents, total antioxidant activities were determined in extracts and fractions. The isolated compounds were identified as rutin, rosmarinic acid and caffeic acid. This thesis is considered to be a bases of studies on anticarcinogenic properties of *Prunella* L. plants in future.

**Keywords:** *Lamiaceae*, *Prunella* L., HPLC, total phenol content, total antioxidant activity, immobilized enzymatic method, multivariate calibration techniques, isolation.  
**2011, 139 + xiv pages**

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez kapsamında *Prunella* L. türlerinin (*Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella grandiflora* L., *Prunella orientalis* Bornm.) spektroskopik, kromatografik, kemometrik ve izolasyon çalışmaları Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Kromatografi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Bugüne kadar bu çalışmaların tamamlanabilmesi için bana her türlü desteği gösteren, yarınım da aynı desteği göstereceğine inandığım ve bilimsel alanda beni yetiştirmesinden dolayı sonsuza dek onur duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cevdet DEMİR'e en içten şükranlarımı sunarım.

Tez izleme komitemde yer alan, her tez gelişme döneminde beni sabırla dinleyen, çalışmalarım süresince her türlü bilimsel desteği gösteren Sayın Prof. Dr. Şeref GÜÇER'e ve Prof. Dr. Hulusi MALYER'e destek ve tavsiyeleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalışmalarım süresince her türlü destek, sabır, anlayış ve içtenliği gösteren dost değil kardeşim diyebileceğim başta Yüksek Kimyager Esra IŞIK'a ve Araş. Gör. Önder AYBASTIER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gerek doktora gerekse akademik hayatım boyunca idari ve bilimsel olarak her zaman desteklerini esirgemeyen Sayın Kimya Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Necati BEŞİRLİ'ye ve U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan çok değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarını F-2009/38 nolu proje ile destekleyen U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca maddi, manevi her türlü desteklerinden ve göstermiş oldukları sabır, anlayış, içtenlik ve özveriden dolayı hayatta sahip olduğum en değerlilerim biricik anneme ve babama, sevgili eşime, canımın içi kızıma ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım, iyi ki varsınız.

31/05/2011

**Saliha ŞAHİN**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Fenolik Bileşikler	3
2.1.1. Basit fenolikler	4
2.1.2. Fenolik asitler	4
2.1.3. Asetofenonlar ve fenilasetik asitler	5
2.1.4. Sinnamik asitler	6
2.1.5. Kumarinler	7
2.1.6. Flavonoidler	7
2.1.6.1. Kalkonlar	7
2.1.6.2. Auronlar	8
2.1.6.3. Flavonoidler	8
2.1.6.3.1. Flavanonlar	9
2.1.6.3.2. Flavanonoller	9
2.1.6.3.3. Leukoantosiyanidinler	10
2.1.6.3.4. Flavonlar	10
2.2. Bitkilerde Flavonoller ve Fenolik Bileşikler	11
2.2.1. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin biyosentezi	11
2.2.2. Flavonollerin biyosentezi	15
2.2.3. Bitkilerde flavonoid ve fenolik asitlerin işlevi	15
2.3. <i>Lamiaceae</i> Familyası	17
2.3.1. <i>Prunella</i> L.	18
2.3.2. <i>Prunella</i> L. türlerinde bulunan flavonoidler ve fenolik bileşikler	23
2.4. Analitik Yöntemler	26
2.4.1. Ekstraksiyon ve hidroliz işlemleri	27
2.4.1.1. Flavonoller	27
2.4.1.2. Fenolik bileşikler	29
2.4.2. Kromatografik teknikler	30
2.4.2.1. Flavonoller	31
2.4.2.2. Fenolik bileşikler	32
2.4.3. Flavonollerin ve fenolik asitlerin belirlenmesi ve tayini	33
2.4.4. Spektroskopik teknikler	35
2.4.4.1. Toplam fenol tayinleri	35
2.4.4.2. Toplam antosiyanin tayini	37
2.4.4.3. Antioksidan aktivite tayinleri	38
2.4.4.3.1. ABTS yöntemi	39
2.4.4.3.2. DPPH yöntemi	40
2.4.5. Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliği	41



2.5. İzolasyon	44
2.6. Kemometrik Yöntemler	47
2.6.1. Verilerin analize hazırlanması	47
2.6.1.1. Optimize korelasyon düzeltmesi	47
2.6.1.2. Merkezileştirme	49
2.6.1.3. Sinyal düzeltme	50
2.6.1.4. Normalizasyon	50
2.6.2. Çok değişkenli kalibrasyon teknikleri	51
2.6.2.1. Temel bileşen regresyon analizi	51
2.6.2.2. Kısmi en küçük kareler regresyon analizi	52
2.6.2.3. Ortogonal sinyal düzeltmesi	53
3. MATERYAL ve YÖNTEM	55
3.1. Materyal	55
3.1.1. Çalışmada kullanılan aletler	55
3.1.1.1. Mor ötesi-görünür bölge (UV/VIS) spektrofotometresi	55
3.1.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)	55
3.1.1.3. Sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS)	55
3.1.1.4. pH metre	55
3.1.1.5. Analitik terazi	56
3.1.1.6. Saf su cihazı	56
3.1.1.7. Döner buharlaştırıcı	56
3.1.1.8. Çoklu manyetik karıştırıcı	56
3.1.1.9. Etüv	56
3.1.1.10. Peristaltik pompa	56
3.1.1.11. Ultrasonik banyo	57
3.1.2. Çalışmada kullanılan bitki türleri	57
3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	57
3.1.3.1. Kimyasallar	57
3.1.3.1.1. Analitik saflıktaki kimyasallar	57
3.1.3.1.2. Diğer kimyasallar	58
3.1.3.1.3. Sarf malzemeler	58
3.1.3.2. Çözeltiler	59
3.1.3.2.1. Asidik hidroliz ekstraksiyonunda kullanılan çözeltiler	59
3.1.3.2.2. Toplam fenol, toplam antioksidan aktivite ve toplam antosiyanin tayinlerinde kullanılan çözeltiler	59
3.1.3.2.3. Standart fenolik maddeler ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması	60
3.2. Yöntem	61
3.2.1. Örnek hazırlama işlemleri	61
3.2.1.1. Bitki türlerinin toplanması ve analize hazırlanması	61
3.2.1.2. Ekstraksiyon çalışmaları	62
3.2.2. Spektroskopik yöntemler	62
3.2.2.1. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenol tayini	62
3.2.2.2. Serbest enzim yöntemi ile toplam fenol tayini	63
3.2.2.3. Enzim immobilizasyonu	63
3.2.2.4. İmmobilize HRP yöntemi ile toplam fenol tayini	64
3.2.2.5. Bradford yöntemi	65

3.2.2.6. HRP aktivite tayini	65
3.2.2.7. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enziminin ve serbest HRP enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesi	66
3.2.2.8. Toplam antosiyanin tayini	66
3.2.2.9. ABTS yöntemi	67
3.2.2.10. DPPH yöntemi	68
3.2.3. Kromatografik yöntemler	68
3.2.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)	68
3.2.3.2. Sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS)	69
3.2.4. Kemometrik yöntemler	69
3.2.5. İzolasyon çalışmaları	70
4. BULGULAR	73
4.1. Spektroskopik Yöntemler	73
4.1.1. Toplam fenol tayinleri	73
4.1.2. Enzim immobilizasyonu	73
4.1.3. Toplam fenol miktarları	79
4.1.4. Toplam antosiyanin miktarları	80
4.1.5. Toplam antioksidan aktivite tayinleri	81
4.2. Kromatografik Yöntemler	83
4.2.1. <i>Prunella</i> L. türlerinde bulunan fenolik maddeler	85
4.2.2. Analitik yöntem validasyonu	90
4.2.3. LC-MS analizleri	91
4.3. Kemometrik Yöntemler	92
4.3.1. Toplam fenol tayinleri	92
4.3.2. Toplam antioksidan aktivite tayinleri	96
4.4. İzolasyon çalışmaları	100
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	104
5.1. Spektroskopik Yöntemler	104
5.1.1. Enzimatik reaksiyonlar	106
5.1.2. İmmobilizasyon zamanının optimizasyonu	106
5.1.3. Fenolik madde/4-aminoantipirin oranının etkisi	107
5.1.4. İmmobilize HRP enziminin optimum kullanım sayısı	107
5.1.5. İmmobilize HRP enziminin optimum depolanma süresi	108
5.1.6. Serbest ve immobilize HRP enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin incelenmesi	108
5.1.7. <i>Prunella</i> L. türlerinin toplam fenol miktarları	108
5.2. Kromatografik Yöntemler	110
5.2.1. <i>Prunella</i> L. türlerinde tayin edilen fenolik maddeler	110
5.2.2. Ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin etkisi	112
5.2.3. Analitik yöntem validasyonu	113
5.2.4. LC-MS tayinleri	114
5.3. Kemometrik Yöntemler	114
5.3.1. Toplam fenol tayinleri	114
5.3.1.1. PCR ve PLS	115
5.3.2. Toplam antioksidan aktivite tayinleri	117
5.3.2.1. PLS ve OSC-PLS	119
5.4. İzolasyon Çalışmaları	121

5.4.1. Fenolik maddelerin izolasyonu ve tayini	121
5.4.2. Toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite sonuçları	122
5.5. <i>Prunella</i> L. Türlerinin Antikanserojenik Özelliklerinin İncelenmesi	123
5.6. Sonuç	123
KAYNAKLAR	126
ÖZGEÇMİŞ	139

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

$L^{\cdot}$	Lipid radikali
$LOO^{\cdot}, ROO^{\cdot}$	Peroksil radikali
$LO^{\cdot}$	Alkoksil radikali
$AH$	Antioksidan
$LH$	Lipid
${}^mX_{ij}$	Merkezileştirilmiş matris
$x_{ij}$	$i$ 'inci satır $j$ 'inci sütundaki matris elemanı
$x_j^{ort}$	Kolon ortalaması
${}^N X_{ij}$	Normalize edilmiş matris
$x_j$	$j$ 'inci sütundaki matris elemanı
$b$	Korelasyon katsayısı
$y$	Gerçek konsantrasyon
$\hat{y}$	Tahmini konsantrasyon
$X$	Veri matrisi
$X_{OSCPLS}$	Ortogonal sinyal düzeltmesi yapılmış matris
$T_o, T$	Skor matrisi
$P_o, P, q$	Loading matrisi
$E, F$	Hata
$U$	Matris değişkenleri

### Kısaltmalar

### Açıklama

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization (Atmosferik basınç kimyasal iyonlaşma)
API-ESI	Atmospheric pressure ionization-electrospray ionization (Atmosferik basınç iyonlaşma-elektrosprey iyonlaşma)
API-MS	Atmospheric pressure ionization-mass spectrometry (Atmosferik basınç iyonlaşma-kütle spektrometri)
BHA	Butilhidroksi anisol
BHT	Butilhidroksi toluen
TBHQ	Ter-buthyl hydroquinone (Ter-butyl hidrokinon)
COW	Correlation optimized warping (Optimize korelasyon düzeltmesi)
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ESI	Electrospray ionization (Elektrosprey iyonlaşma)

GC	Gas chromatography (Gaz kromatografisi)
GC-MS	Gas chromatography- mass spectrometry (Gaz kromatografî-kütle spektrometri)
HPLC	High performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
HPLC-DAD	High performance liquid chromatography-diode array dedector (Yüksek performanslı sıvı kromatografî-diod serili dedektör)
HPLC-ESI-MS	High performance liquid chromatography- electrospray ionization- mass spectrometry (Yüksek performanslı sıvı kromatografî-elektrosprey iyonlaşma- kütle spektrometri)
HPLC-MS	High performance liquid chromatography- mass spectrometry (Yüksek performanslı sıvı kromatografî-kütle spektrometri)
HPLC-NMR	High performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (Yüksek performanslı sıvı kromatografî- nükleer magnetik rezonans)
HPLC-UV	High performance liquid chromatography-ultraviolet spectrometry (Yüksek performanslı sıvı kromatografî-ultraviyole spektrometre)
HPLC-UV/MS	High performance liquid chromatography- ultraviolet-mass spectrometry (Yüksek performanslı sıvı kromatografî-ultraviyole-kütle spektrometri)
HRP	Horseradish peroksidaz enzimi
LC	Liquid chromatography (Sıvı kromatografisi)
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry (Sıvı kromatografî-kütle spektrometri)
LC/MS/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry (Sıvı kromatografî-kütle spektrometri-kütle spektrometri)
LC/NMR	Liquid chromatography- nuclear magnetic resonance (Sıvı kromatografî- nükleer magnetik rezonans)
LC/UV	Liquid chromatography- ultraviolet spectrometry (Sıvı kromatografî-ultraviyole spektrometre)
LC/UV-DAD	Liquid chromatography-ultraviolet-diod array dedector (Sıvı kromatografî-ultraviyole-diod serili dedektör)
LOD	Limit of detection (Tayin sınırı)
LOQ	Limit of quantitation (Tayin edilebilen en küçük derişim)
MS	Mass spectrometry (Kütle spektrometri)
MS/MS	Mass spectrometry-mass spectrometry (Kütle spektrometri/kütle spektrometri)
NMR	Nuclear magnetic resonance

OSC	(Nükleer magnetik rezonans) Orthogonal signal correction (Ortagonal sinyal düzeltmesi)
PCR	Principal component regression (Temel bileşen regresyon analizi)
PLS	Partial least squares regression (Kısmı en küçük kareler regresyonu)
SPE	Solid phase extraction (Kati faz ekstraksiyonu)
STY-DVB-PGA	Stiren-divinillbenzen-poligluteralehit
TLC	Thin layer chromatography (İnce tabaka kromatografı)
UV	Ultraviolet (Mor ötesi)
UV/VIS	Ultraviolet-visible spectrophotometry (Mor ötesi-görünür bölge spektrofotometre)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 2.1.1.	Fenol bileşiğinin yapısı	4
Şekil 2.1.1.1.	Basit fenolik maddeler (R, R1, R2 fonksiyonel gruplar)	4
Şekil 2.1.2.1.	Hidroksibenzoik asitler	5
Şekil 2.1.2.2.	Hidroksibenzoik asitler ve hidroksibenzoik aldehitler	5
Şekil 2.1.3.1.	Fenonlar	5
Şekil 2.1.4.1.	Sinnamik asitler	6
Şekil 2.1.4.2.	Klorojenik asit	6
Şekil 2.1.5.1.	Umbelliferon	7
Şekil 2.1.6.1.1.	Kalkonlar	7
Şekil 2.1.6.2.1.	Auronlar	8
Şekil 2.1.6.3.1.	Flavonoidlerin kimyasal yapısı (R1, R2 fonksiyonel gruplar)	8
Şekil 2.1.6.3.2.	İzoflavon ve neoflavonoid yapısı	9
Şekil 2.1.6.3.1.1.	Naringenin	9
Şekil 2.1.6.3.2.1.	Taksifolin	10
Şekil 2.1.6.3.3.1.	Leukoantosiyanidinler	10
Şekil 2.1.6.3.4.1.	En yaygın bulunan flavonlar	11
Şekil 2.2.1.1.	Hidroksisinnamik asit, hidroksibenzoik asit ve flavonoidlerin biyosentezi	13
Şekil 2.3.1.1.	<i>Prunella vulgaris</i> L. Türkiye'deki yayılış haritası	19
Şekil 2.3.1.2.	<i>Prunella vulgaris</i> L. (Tuncay Dirmenci)	19
Şekil 2.3.1.3.	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. Türkiye'deki yayılış haritası	20
Şekil 2.3.1.4.	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. (Tuncay Dirmenci)	20
Şekil 2.3.1.5.	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. Türkiye'deki yayılış haritası	21
Şekil 2.3.1.6.	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. (Tuncay Dirmenci)	21
Şekil 2.3.1.7.	<i>Prunella grandiflora</i> L. Türkiye'deki yayılış haritası	22
Şekil 2.3.1.8.	<i>Prunella grandiflora</i> L. (Tuncay Dirmenci)	22
Şekil 2.4.1.	Bitkilerde ve gıdalarda bulunan flavonoidlerin tayin yöntemleri	26
Şekil 2.4.1.1.1.	Flavonoid glikozitlerden luteolin-7-O-glikozit yapısı	28
Şekil 2.4.4.1.1.	Enzimatik yöntem mekanizması (HRP: Horseradish peroksidaz enzimi)	36
Şekil 2.4.4.3.2.1.	Antioksidanların DPPH ile radikal süpürme reaksiyonu	40
Şekil 2.4.5.1.	Hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitlere serbest radikal süpürme özelliği veren yapılar	41
Şekil 2.4.5.2.	Flavonoidlere serbest radikal süpürme aktivitesi özelliği veren karakteristik yapılar	42
Şekil 2.4.5.3.	Antioksidan aktiviteyi azaltıcı yönde etki eden glikozit ve diglikozit yapılar	43
Şekil 2.5.1.	Flavonoidlerin analizlerinde kullanılan kromatografik teknikler	45
Şekil 2.6.1.1.1.	a) Alıkonma zamanlarında kayma olan kromatografik pikler, b) Optimize korelasyon düzeltilmesi yapıldıktan sonra düzelmiş kromatografik pikler	49
Şekil 2.6.2.2.1.	Kısmi en küçük kareler regresyon matrislerinin grafiksel	53

	gösterimi	
Şekil 2.6.2.3.1.	a) Gürültü şiddeti yüksek olan pik, b) OSC ile gürültü etkisi ortadan kaldırılmış pik	54
Şekil 3.2.2.3.1.	İmmobilize olmuş HRP	64
Şekil 4.1.2.1.	Bradford yöntemi için kalibrasyon grafiği	74
Şekil 4.1.2.2.	Optimum immobilizasyon süresi	74
Şekil 4.1.2.3.	İmmobilize HRP yöntemine gallik asit/4-aminoantipirin oranının etkisi	75
Şekil 4.1.2.4.	İmmobilize HRP enziminin kullanım sayısının değişimi	76
Şekil 4.1.2.5.	İmmobilize HRP enziminin depolanma süresi ile toplam fenol yüzdesi arasındaki değişim	76
Şekil 4.1.2.6.	Serbest HRP enzimi için çizilen Lineweaver-Burk denklemi grafiği	77
Şekil 4.1.2.7.	STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enzimi için çizilen Lineweaver-Burk denklemi grafiği	78
Şekil 4.1.3.1.	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. için toplam fenol miktarları	79
Şekil 4.1.3.2.	<i>Prunella vulgaris</i> L. için toplam fenol miktarları	79
Şekil 4.1.3.3.	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. için toplam fenol miktarları	80
Şekil 4.1.3.4.	<i>Prunella grandiflora</i> L. için toplam fenol değerleri	80
Şekil 4.2.1.1.	Standart 10 mg/L fenolik maddelere ait HPLC kromatogramı (1; protokatekuik asit, 2; klorojenik asit, 3; kafeik asit, 4; rutin, 5; ferulik asit, 6; rosmarinik asit, 7; kuersetin)	85
Şekil 4.2.1.2.	<i>Prunella vulgaris</i> L. su-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı	86
Şekil 4.2.1.3.	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. su-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı	86
Şekil 4.2.1.4.	<i>Prunella grandiflora</i> L. su-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı	87
Şekil 4.2.1.5.	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. su-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı	87
Şekil 4.2.3.1.	LC-MS spektrumları; a) kamferol (17,7 dk), b) kuersetin glikozit (3,5 dk), kamferol glikozit (3,8 dk)	91
Şekil 4.3.1.1.	Merkezleştirilmiş veri için toplam fenol değerleri; a) PCR ile bulunan değerler b) PLS ile bulunan değerler	94
Şekil 4.3.1.2.	Merkezleştirilmiş veri ile bulunan PLS skor grafiği	95
Şekil 4.3.1.3.	Merkezleştirilmiş veri ile bulunan PLS loading grafiği	95
Şekil 4.3.2.1.	Merkezleştirilmiş veri için toplam antioksidan aktivite değerleri; a) ABTS yöntemi için OSC-PLS ile bulunan değerler b) DPPH yöntemi için OSC-PLS ile bulunan değerler	97
Şekil 4.3.2.2.	Merkezleştirilmiş veri ile bulunan OSC-PLS skor grafiği a) ABTS yöntemi, b) DPPH yöntemi	98
Şekil 4.3.2.3.	Merkezleştirilmiş veri ile bulunan OSC-PLS loading grafiği a) ABTS yöntemi, b) DPPH yöntemi	99
Şekil 4.4.1.	<i>Prunella vulgaris</i> L. metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların absorpsiyon grafiği	100
Şekil 4.4.2.	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. metanol ekstraktından elde	100



Şekil 4.4.3.	edilen fraksiyonların absorbans grafiği <i>Prunella grandiflora</i> L. metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların absorbans grafiği	101
Şekil 4.4.4.	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların absorbans grafiği	101
Şekil 4.4.5.	Standart fenolik maddelerden (rosmarinik asit, rutin ve kafeik asit) elde edilen fraksiyonların absorbans grafiği	102
Şekil 5.1.1.	Tyrosin fenolik hidroksil grubu	104

## ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.1.	Fenolik bileşik sınıfları	3
Çizelge 2.3.1.	Aglikon ve glikozitlerin <i>Lamioideae</i> ve <i>Nepetoideae</i> alt familyalarına dağılımı	18
Çizelge 2.3.2.1.	<i>Prunella</i> L. türlerinde bulunan flavonoidler ve fenolik bileşikler	25
Çizelge 2.4.3.1.	LC-MS ile yapılan flavonoid analizleri	35
Çizelge 2.5.1.	HPLC ve NMR ile yapılan fenolik madde çalışmaları	46
Çizelge 3.1.1.1.1.	Varian marka Cary-50 Conc cihazının çalışma şartları	55
Çizelge 3.2.3.1.1.	HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları	69
Çizelge 3.2.3.2.1.	LC-MS için analiz çalışma koşulları	69
Çizelge 3.2.5.1.	Sephadex LH-20 özellikleri	72
Çizelge 4.1.1.1.	Toplam fenol tayinleri için kalibrasyon grafikleri	73
Çizelge 4.1.2.1.	Serbest HRP enzimi için [S] ve V değerleri	77
Çizelge 4.1.2.2.	STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enzimi için [S] ve V değerleri	78
Çizelge 4.1.4.1.	Toplam antosiyanin miktarları	81
Çizelge 4.1.5.1.	Toplam antioksidan aktivite tayinleri için kalibrasyon grafikleri	81
Çizelge 4.1.5.2.	<i>Prunella</i> L. ekstraktlarının ABTS yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan aktivite değerleri	82
Çizelge 4.1.5.3.	<i>Prunella</i> L. ekstraktlarının DPPH yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan aktivite değerleri	82
Çizelge 4.2.1.	Standart fenolik maddeler için HPLC-DAD kalibrasyon grafikleri	83
Çizelge 4.2.2.	Standart fenolik maddeler	84
Çizelge 4.2.1.1.	Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak <i>Prunella</i> L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/g örnek)	88
Çizelge 4.2.1.2.	Asidik hidroliz yöntemi kullanılarak <i>Prunella</i> L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/g örnek)	89
Çizelge 4.2.2.1.	Analitik yöntem validasyonu ve geri kazanım değerleri	90
Çizelge 4.2.3.1.	<i>Prunella</i> L. türlerinde bulunabilecek muhtemel fenolik maddeler	92
Çizelge 4.3.1.1.	Folin yöntemi ile bulunan toplam fenol değerleri	93
Çizelge 4.3.1.2.	Kemometrik yöntemlerle bulunan toplam fenol tayinleri için hata değerleri	93
Çizelge 4.3.2.1.	Kemometrik yöntemlerle bulunan toplam antioksidan aktivite tayinleri için hata değerleri	96
Çizelge 4.4.1.	Fraksiyonlarda ve ekstraktlarda bulunan fenolik madde miktarları	102
Çizelge 4.4.2.	Fraksiyonların ve ekstraktların toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değerleri	103

## 1. GİRİŞ

Antioksidanlar, vücudumuzdaki kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan veya dış etkenler tarafından oluşturulan ve hücrelere zarar veren serbest radikalleri etkisiz hale getirerek kanser dahil pek çok hastalığa neden olabilecek zincir reaksiyonları önleyen moleküllerdir. Gıdaların üretimindeki değişik ve yapay işlemler nedeniyle de vücuda serbest radikal alımı artarak, bunların reaksiyonu sonucu oluşan toksik maddeler vücudumuzda birikmektedir. Vücudumuzda biriken bu toksik maddeleri atmak ve onların zararlı etkilerinden kurtulmak için antioksidan maddeler içeren besinler alınması gereklidir. Böylece serbest radikallerin meydana getirdiği hücre tahribatı büyük ölçüde önlenmiş olur. Bu nedenle antioksidan özellikli bileşikler içeren doğal ürünlerin araştırılması insan sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır.

Bilinen ve halen ticari olarak kullanılan sentetik antioksidanlar (butilhidroksi toluen-BHT, butilhidroksi anisol-BHA, ter-butil hidrokinon-TBHQ gibi) kimyasal yapılarında fenolik gruba sahiptirler. Antioksidan etkiden sorumlu yapının da bu fenolik gruplar olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, son yıllarda kimyasal yapısında fenolik bileşikler içeren bitki türleri ve bitkisel yağ ile yapılan çalışmalar artmıştır. Doğal antioksidanlar, tokoferoller ve polifenolik maddeler olarak bilinmektedir. Polifenolik doğal antioksidan olarak bilinen ve kullanılan adaçayı (*Salvia officinalis*) ve biberiyenin de (*Rosmarinus officinalis*) bulunduğu *Lamiaceae* familyası bitkileri zengin fenolik bileşik içerikleri nedeniyle insan sağlığı açısından oldukça önemlidir (Tada ve ark. 1996, Kovatcheva ve ark.1996, Morimoto ve ark. 1994, Sumaryono ve ark. 1991, Bertelsen ve ark. 1995). Bu nedenle *Lamiaceae* familyasında bulunan bitki türleri araştırmacılar tarafından antioksidan özellikleri ve fenolik madde içerikleri bakımından yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. *Lamiaceae* familyası içerisinde bulunan *Prunella* L. türlerinin de fenolik bileşikler açısından zengin olduğu literatürde belirtilmektedir (Cheung ve Zhang 2008).

*Lamiaceae* familyasında yer alan *Prunella* L. türleri Avrupa, Akdeniz, Kuzey Afrika, Amerika ve Avustralya olmak üzere dünyada çok geniş bir yayılış gösteren çok yıllık otsu bitkilerdir. *Prunella* L. cinsinin Ülkemizde yayılışı saptanan *Prunella vulgaris* L.,

*Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella orientalis* Bornm., ve *Prunella grandiflora* L. olmak üzere 4 türü bulunmaktadır. *Prunella* L. türleri üzerinde yapılan çalışmalarda; türlerin antiinflamatuar, antiviral, antikanser, antioksidan ve antihiperglisemik aktivite özelliklerine sahip oldukları bulunmuştur (Davis ve Tan 1988, Baytop 2000, Psotova ve ark. 2003, Nolkemper ve ark. 2006, Zheng ve ark. 2007).

Bu çalışmanın amacı; ülkemizde yetişen *Prunella* L. türlerindeki fenolik maddelerin kantitatif tayinlerine, antioksidan etkili bileşiklerin izolasyon çalışmalarına, toplam fenol ve antioksidan aktivite tayinlerine yönelik yöntemler geliştirmektir. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre bitkinin çay olarak kullanılabilirliği ve ekonomik önemi konusunda bilgi sahibi olunabilecektir. Bu amaçla *Prunella* L türleri, Bursa, Balıkesir ve Antalya illerinden Mayıs-Haziran aylarında toplanarak uygun çalışma şartlarında muhafaza edilmiştir. Farklı polaritedeki çözücülerle hazırlanan ekstraktlarda bulunan fenolik maddelerin kalitatif ve kantitatif tayin çalışmaları, ekstraktların toplam fenol ve antioksidan aktivite tayinleri, antioksidan aktivitesi yüksek olan ekstraktlar için izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Fenolik maddelerin kalitatif ve kantitatif tayinleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kemometrik yöntemlerle toplam fenol ve antioksidan aktivite hesaplamaları yapılarak tahmini değerler gerçek değerlerle karşılaştırılmıştır. Kemometrik yöntemler ile yapılan çalışmalar sonucunda toplam fenol ve antioksidan aktiviteye katkısı olan fenolik maddeler belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

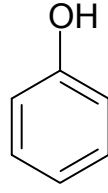
### 2.1. Fenolik Bileşikler

Aromatik halkaya bağlı bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren moleküllere fenolik bileşikler denir. Fenolik bileşikler çok geniş ve farklı bileşik sınıflarını içeren kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşikler çok farklı şekilde sınıflandırılabilirler. Harborne ve Simmonds (1964) göre fenolik bileşikler molekülde bulunan karbon sayısına göre sınıflandırılırlar (Çizelge 2.1.1).

**Çizelge 2.1.1.** Fenolik bileşik sınıfları

Karbon sayısı	Sınıf
C <sub>6</sub>	Basit fenolikler
C <sub>6</sub> – C <sub>1</sub>	Fenolik asitler
C <sub>6</sub> – C <sub>2</sub>	Asetofenonlar ve fenilasetik asitler
C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub>	Sinnamik asitler, sinamil aldehytler, sinamil alkoller
C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub>	Kumarinler, izokumarinler, kromonlar
C <sub>15</sub>	Kalkonlar, auronlar, dihidrokalkonlar
C <sub>15</sub>	Flavanlar
C <sub>15</sub>	Flavonlar
C <sub>15</sub>	Flavanonlar
C <sub>15</sub>	Flavanonoller
C <sub>15</sub>	Antosiyanidinler, antosiyaninler
C <sub>6</sub> – C <sub>1</sub> – C <sub>6</sub> , C <sub>6</sub> – C <sub>2</sub> – C <sub>6</sub>	Benzofenonlar, ksantonlar, stilbenler
C <sub>6</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>14</sub>	Kuinonlar
C <sub>18</sub>	Betasiyaninler
Lignan, neolignan	Dimerler veya oligomerler
Lignin	Polimerler
Taninler	Oligomerler veya polimerler
Filobafenler	Polimerler

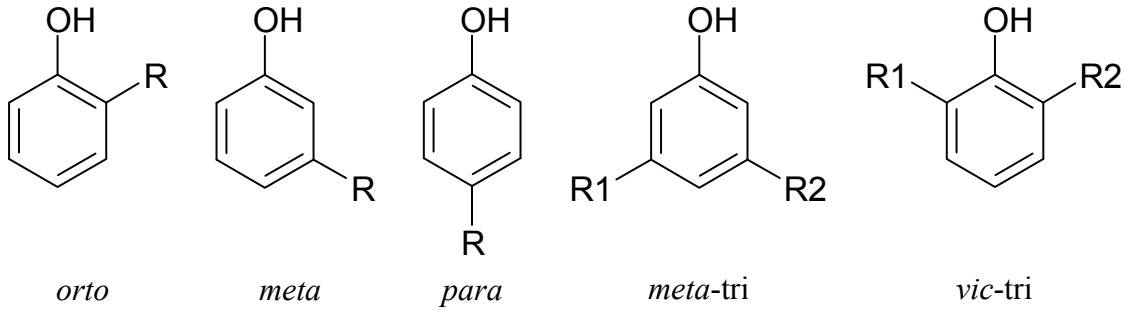
Fenol, bu bileşik grubunda bulunan en temel bileşiktir (Şekil 2.1.1). Fenolik bileşikler, alkollere göre daha asidik olmalarına rağmen organik asitlerle karşılaştırıldıklarında zayıf asidik özellik gösterirler.



Şekil 2.1.1. Fenol bileşiğinin yapısı

### 2.1.1. Basit fenolikler

Basit fenolik maddeler, substitue fenollerdir. Benzen halkasında bulunan hidroksil grubuna göre farklı fonksiyonel gruplar; *orto* (1,2-), *meta* (1,3-) ve *para* (1,4-) konumlarında benzen halkasına bağlanabilirler. Eğer üç fonksiyonel grup 1,3,5 konumlarında benzen halkasına bağlanırsa *meta*-tri; 1,2,6, konumunda bağlanırsa *vic*-tri şeklinde isimlendirilir (Şekil 2.1.1.1).

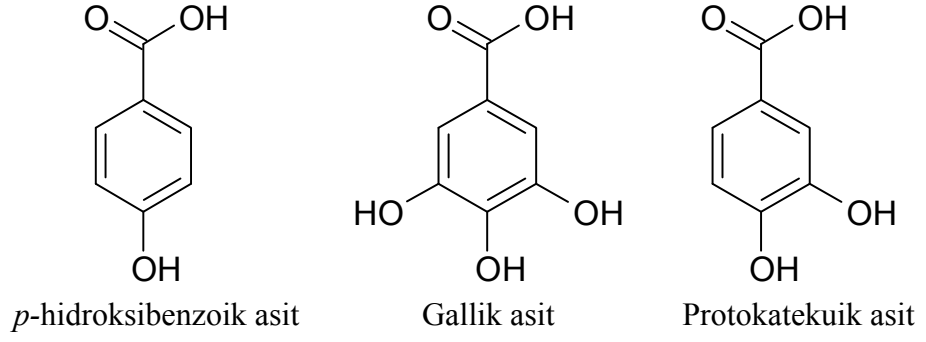


Şekil 2.1.1.1. Basit fenolik maddeler (R, R1, R2 fonksiyonel gruplar)

Basit fenolik maddelere resorsinol (1,3-dihidroksibenzen), ploroglusinol (1,3,5-trihidroksibenzen) örnek verilebilir.

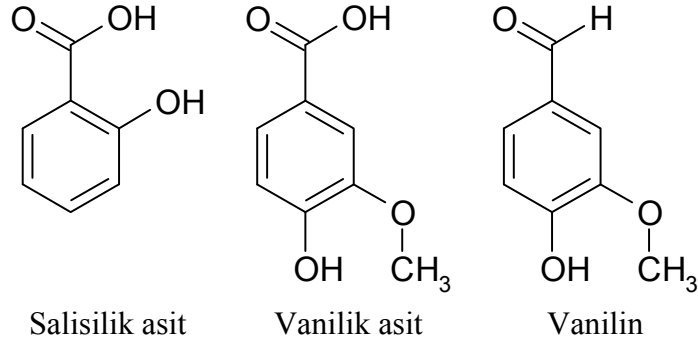
### 2.1.2. Fenolik asitler

Hidroksibenzoik asitler, fenol bileşiğine karboksil grubunun bağlanması ile karakterize edilirler. *p*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, protokatekuik asit (Şekil 2.1.2.1), salisilik asit ve vanilik asit (Şekil 2.1.2.2) hidroksibenzoik asitlere örnek verilebilir.



**Şekil 2.1.2.1.** Hidroksibenzoik asitler

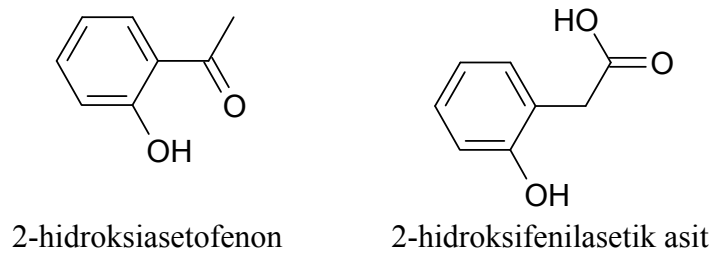
Örneğin vanilin, fenol bileşiğine bağlı karboksil grubunun yerine aldehit grubunun bağlanması ile oluşan hidroksibenzoik aldehit bileşiğidir (Şekil 2.1.2.2).



**Şekil 2.1.2.2.** Hidroksibenzoik asitler ve hidroksibenzoik aldehitler

### 2.1.3. Asetofenonlar ve fenilasetik asitler

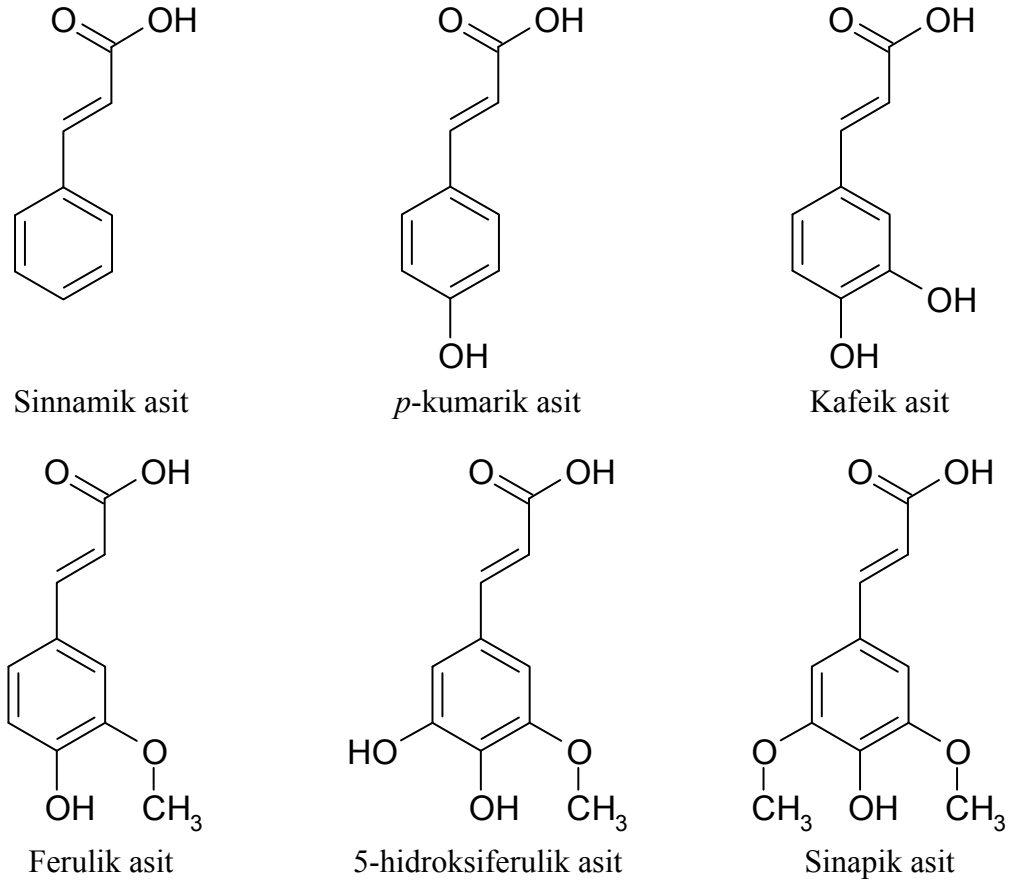
Fenonlar,  $C_6-C_2$  yapısında olan doğada nadir bulunan bileşiklerdir. 2-hidroksiasetofenon ve 2-hidroksifenilasetik asit bileşikleri fenonlara örnek verilebilir (Şekil 2.1.3.1).



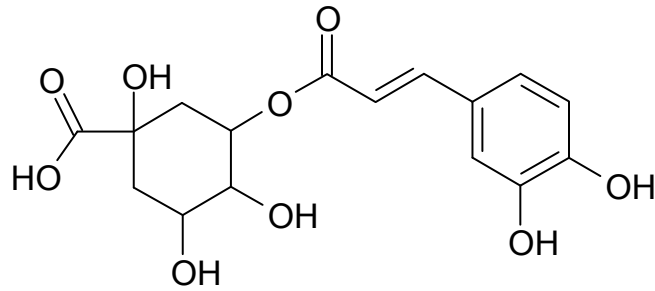
**Şekil 2.1.3.1.** Fenonlar

#### 2.1.4. Sinnamik asitler

C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> yapısında bulunan en yaygın sinnamik asitler; sinnamik, *p*-kumarik, kafeik, ferulik, 5-hidroksiferulik ve sinapik asitlerdir (Şekil 2.1.4.1). Sinnamik asitler, genellikle bitkilerde kuinik, sihikimik ve tartarik asitlerin esterleri halinde bulunurlar. Örneğin klorojenik asit, kafeik ve kuinik asitin esteridir (Şekil 2.1.4.2).



Şekil 2.1.4.1. Sinnamik asitler

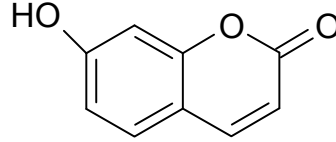


Şekil 2.1.4.2. Klorojenik asit



### 2.1.5. Kumarinler

Kumarinler,  $C_6 - C_3$  yapısında olan ve  $C_3$  biriminde heterosiklik oksijen bulunan bileşiklerdir. Doğada hastalıklara ve zararlı etkilere karşı dirençli pek çok kumarin bileşiği bulunmaktadır. Örneğin umbelliferon (Şekil 2.1.5.1), enzim çalışmalarında çok sık kullanılan kumarin bileşiğidir.



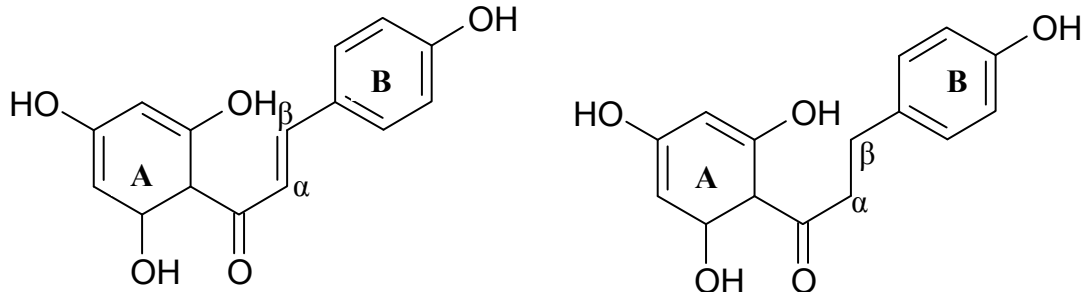
Şekil 2.1.5.1. Umbelliferon

### 2.1.6. Flavonoidler

Flavonoidler benzer şekilde sıralanmış  $C_{15}$  ( $C_6-C_3-C_6$ ) yapısına sahip bileşiklerdir. Flavonoidler C halkasındaki değişiklik nedeniyle; kalkonlar, auronlar, flavonoidler (flavanonlar, flavanonoller, leukoantosiyandinler, flavonlar, antosiyandinler ve antosiyeninler) olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar.

#### 2.1.6.1. Kalkonlar

Kalkonlar ve dihidrokalkonlar, doğrusal  $C_3$ - zincirinde iki halkaya sahiptirler. Kalkonların  $C_3$ - zincirinde çift bağ bulunurken, dihidrokalkonlarda (Şekil 2.1.6.1.1) bu çift bağ bulunmaz.



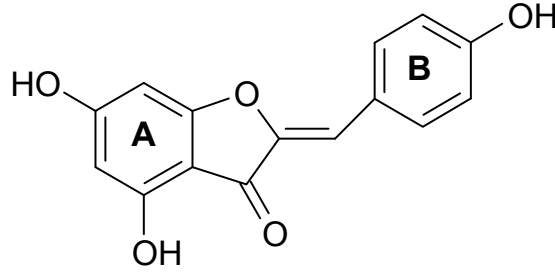
Kalkonlar

Dihidroalkonlar

Şekil 2.1.6.1.1. Kalkonlar

### 2.1.6.2. Auronlar

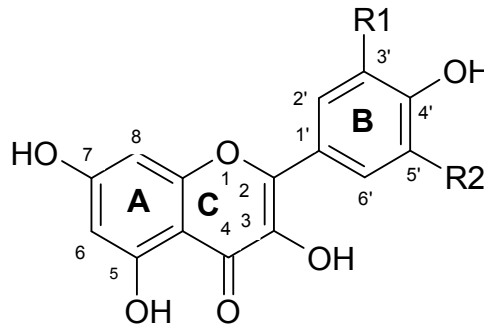
Auronlar, (Şekil 2.1.6.2.1) kalkon yapısındaki meta-hidroksil grubunun  $\alpha$  karbonu ile reaksiyonu sonucu oluşan beş üyeli heterosiklik bir yapı içerirler. Auronlar, genellikle bitkilerde bulunan sarı renkli pigmentlerdir.



Şekil 2.1.6.2.1. Auronlar

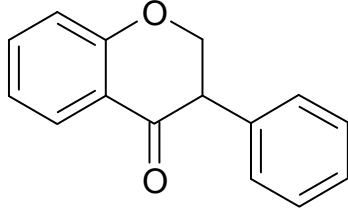
### 2.1.6.3. Flavonoidler

Flavonoidler, iki benzen halkası (A ve B) ve bu halkaları birbirine bağlayan, oksijen içeren piron veya piron halkasından (C) oluşan benzer şekilde sıralanmış  $C_{15}$  ( $C_6-C_3-C_6$ ) yapısına sahip bileşiklerdir (Şekil 2.1.6.3.1). Flavonoidler bitkilerde en fazla glikozit türevleri halinde bulunmalarına rağmen aglikonlar olarak da bulunurlar. Hidroksil gruplarının her biri çeşitli fenolik ve alifatik asitlerle açillenebilir ve bazı karbonlar bir ya da daha fazla farklı basit karbonhidratla yer değiştirebilir. Bitkilerde, flavonoidler hidroksilleme, metilleme ve en önemlisi glikolizleme sonucu çeşitli yapılar da bulunabilirler (Robards ve Antolovich 1997). Ayrıca flavonoid yapısındaki sübstituentler; benzil, sinamil, hidroksil, izofenil ve metoksil olabilir.

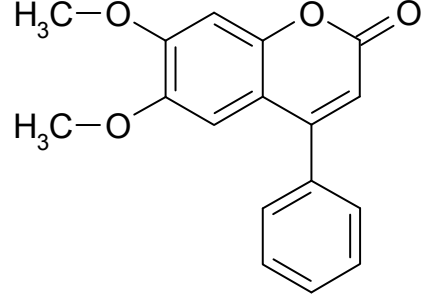


Şekil 2.1.6.3.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı (R1, R2 fonksiyonel gruplar)

İzoflavonlar, izoflavanonlar ve neoflavonoidler, flavonoid grubunda bulunan diğer bileşik sınıflarıdır. C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> yapısına sahip bu bileşiklerde B halkası, C halkasındaki heterosiklik oksijen atomuna göre farklı karbon atomlarından halkaya bağlanabilir (Şekil 2.1.6.3.2).



İzoflavon

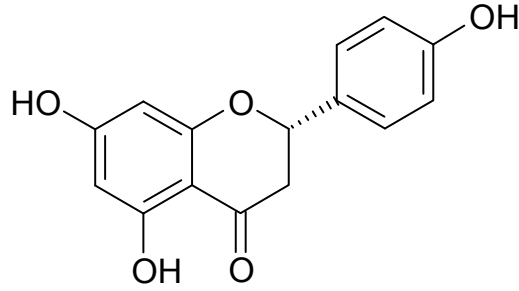


Neoflavonoid (Dalbergin)

Şekil 2.1.6.3.2. İzoflavon ve neoflavonoid yapısı

### 2.1.6.3.1. Flavanonlar

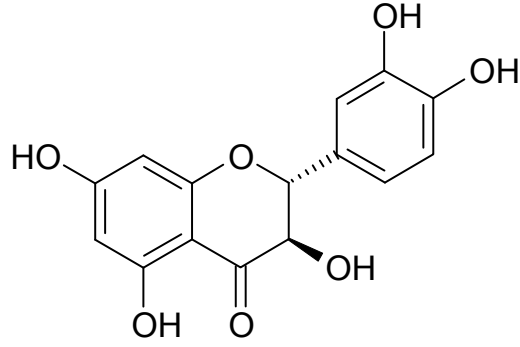
Yapılarında bir keton grubu içeren flavanonlarda doymamış karbon-karbon bağı yoktur. Naringenin, flavanon yapısına en uygun örnektir (Şekil 2.1.6.3.1.1).



Şekil 2.1.6.3.1.1. Naringenin

### 2.1.6.3.2. Flavanonoller

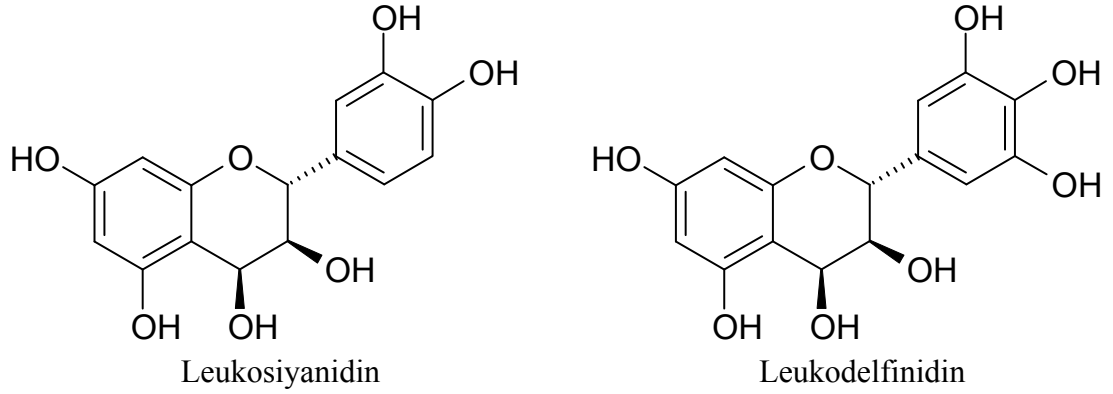
Dihidroflavonol olarak bilinen flavanonoller, genellikle ağaç özlerinde taninlerin birleşmesi ile oluşurlar. Taksifolin (dihidrokuersitin) bileşiği flavanonollere bir örnektir (Şekil 2.1.6.3.2.1).



Şekil 2.1.6.3.2.1. Taksifolin

### 2.1.6.3.3. Leukoantosiyanidinler

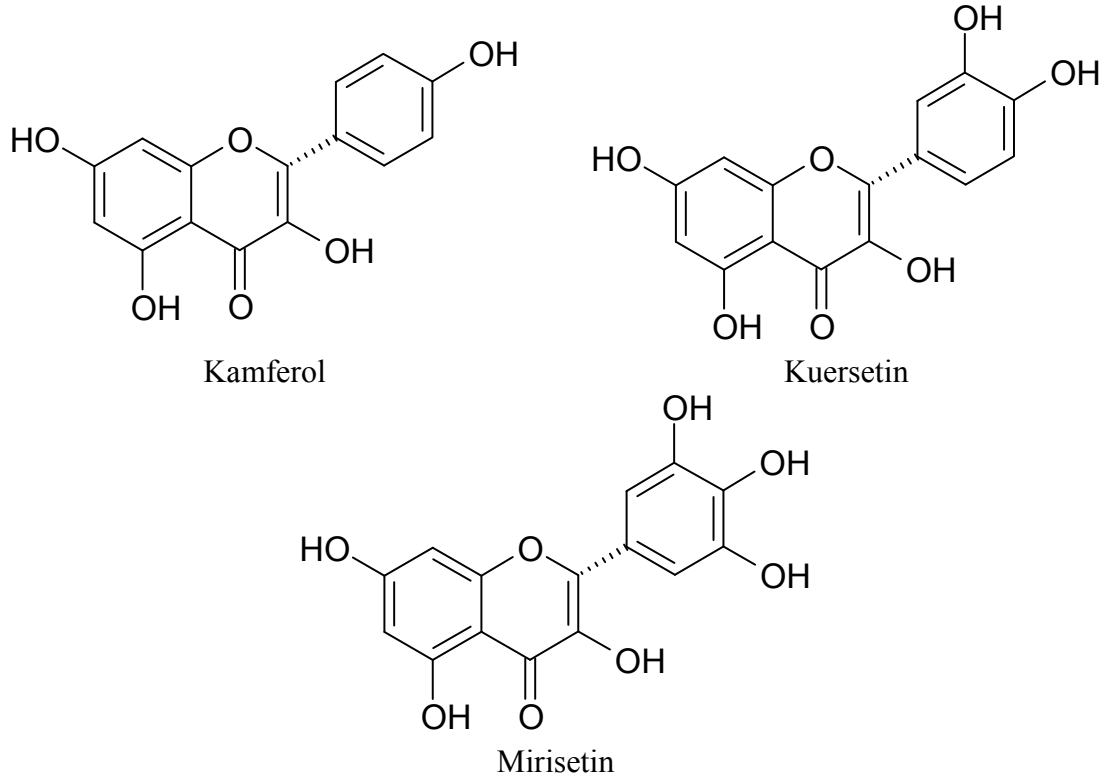
Leukoantosiyanidinler, flavan-3,4-cis-dioller olarak isimlendirilmektedirler. Leukoantosiyanidinler, flavanonollerdeki C<sub>4</sub> karbonundaki keton grubunun indirgenmesi ile sentezlenebilirler. Leukosiyanidin ve leukodelfinidin bileşikleri leukoantosiyanidinlere örnek verilebilir (Şekil 2.1.6.3.3.1). Ağaç yapısında çok sık rastlanan bu bileşikler kondense tanninlerin oluşmasında rol oynarlar.



Şekil 2.1.6.3.3.1. Leukoantosiyanidinler

### 2.1.6.3.4. Flavonlar

Flavonlar yapılarında keton grubu ve doymamış karbon-karbon bağı içerirler. Genellikle kapalı tohumlu bitkilerde bulunurlar. Doğada en yaygın bulunan flavonlar, kamferol, kuersetin ve mirisetindir (Şekil 2.1.6.3.4.1).



Şekil 2.1.6.3.4.1. En yaygın bulunan flavonlar

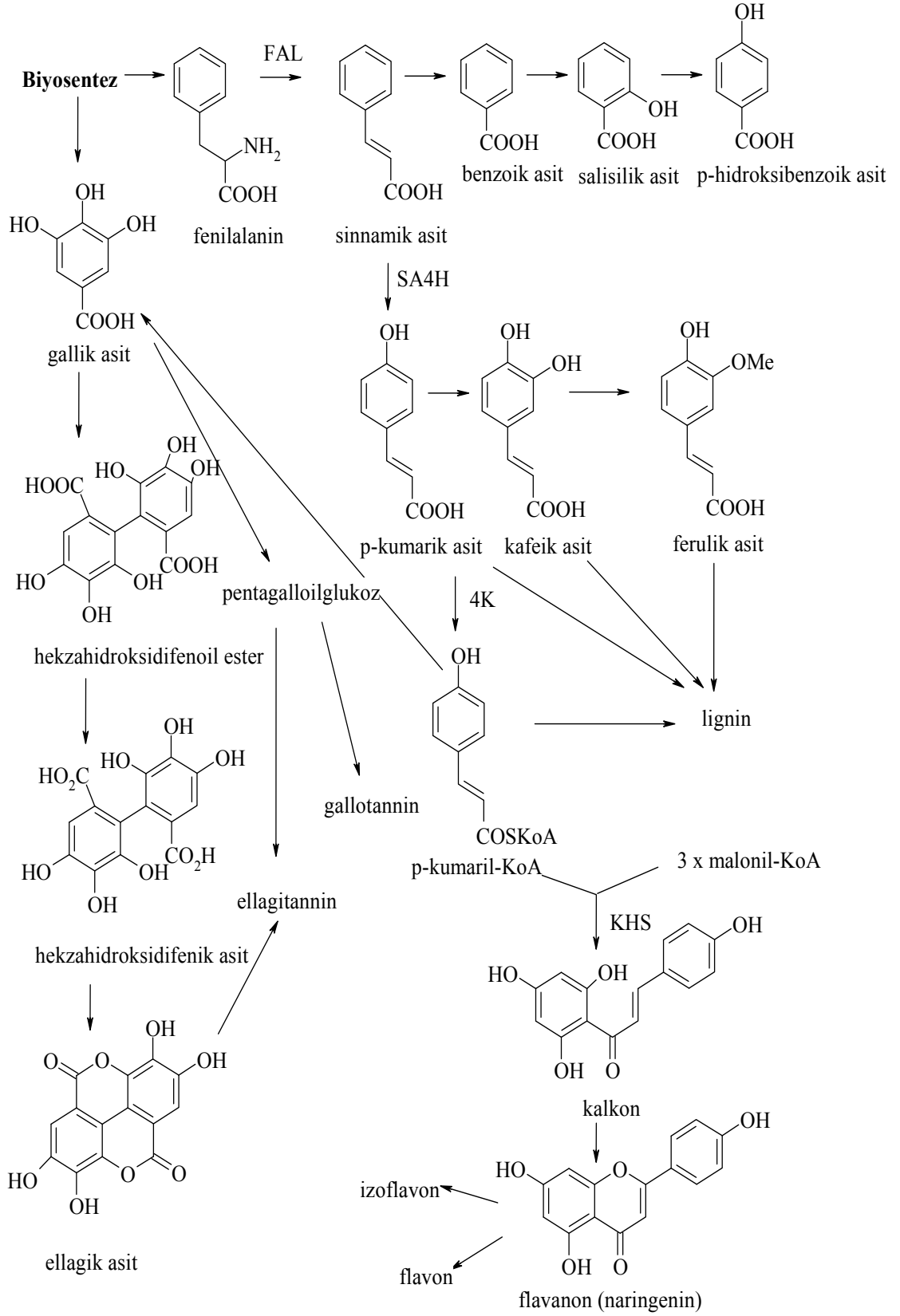
## 2.2. Bitkilerde Flavonoller ve Fenolik Bileşikler

### 2.2.1. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin biyosentezi

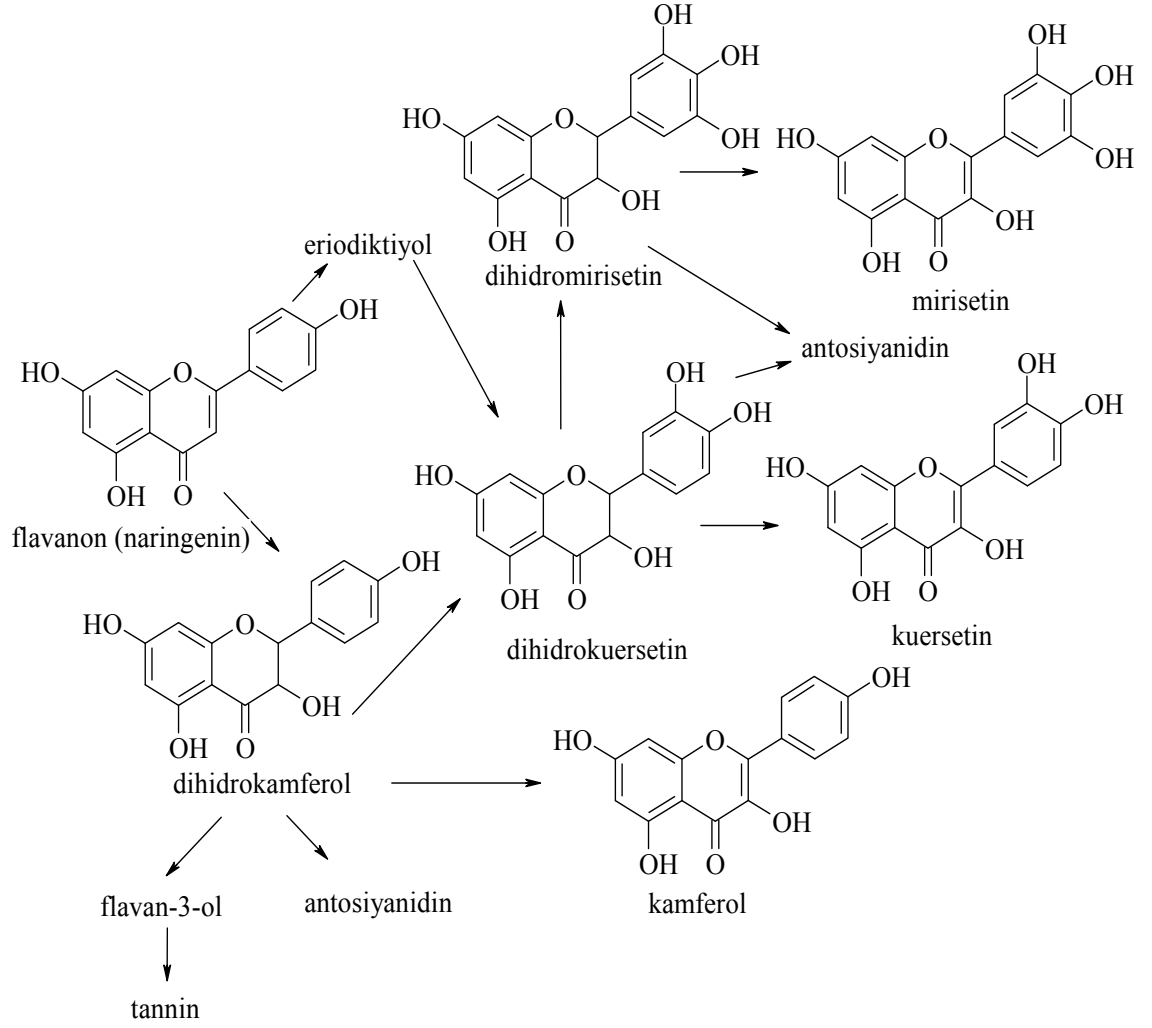
Fenolikler, bir tane hidroksil grubu içeren aromatik halkadan karmaşık polimerik maddelere kadar farklı yapılar olabilmektedirler (Strube ve ark. 1993, Harborne 1994). Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin biyosentez yolları çok iyi bilinmektedir (Haddock ve ark. 1982, Harborne 1988, Macheix ve ark. 1990, Dixon ve Paiva 1995, Strack 1997). Bazı flavonollerin ve fenolik asitlerin biyosentez yolları Şekil 2.2.1.1'de gösterilmiştir. İkincil bileşiklerin biyosentez ve birikim aşamaları bitkinin gelişimsel farklılaşma süresince kontrol altındadır (Macheix ve ark. 1990, Strack 1997). Bu aşamalar ışık, ısı, bitkinin zarar görmesi gibi dış kaynaklı faktörlerden etkilenebilirler (Bennet ve ark. 1994, Dixon ve Paiva 1995). Fenilalanin, bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin oluşmasında öncü olan bir aminoasittir (Macheix ve ark. 1990, Strack 1997). Benzer şekilde hidroksisinnamik asitler ve onların koenzim A esterleri, sinamat

esterleri ve amidleri; lignin, flavonoidler ve tanninler gibi fenolik bileşiklerin yapı taşıdır (Macheix ve ark. 1990). Fenilalanin/hidroksisinnamat aşamaları genel olarak fenilpropanoid metabolizması olarak tanımlanır. Fenilpropanoid metabolizması süreci başlıca L-fenilalaninden hidroksisinnamatlara ve onların aktif şekillerine kadar olan reaksiyonları içerir. Bu sürece özgü aşamalarda katalizlenen enzimler fenilalanin amoniyalaz (FAL), sinnamik asit 4-hidroksilaz (SA4H), ve hidroksisinnamat olan koenzim A ligazdır (K4L). Bu üç basamak fenolik bileşiklerin biyosentezi için gereklidir.

Hidroksisinnamik asitlerin (kafeik, ferulik, 5-hidroksiferulik ve sinapik asit) *p*-kumarik asitten oluşması için iki farklı reaksiyonun gerçekleşmesi gerekir: hidroksilasyon ve metilasyon. Çok iyi bilinen bitki enzim grubu olan monofenol-monooksijenaz tarafından katalizlenerek *p*-kumarik asite ikinci hidroksil grubunun eklenmesiyle kafeik asit elde edilir. Kafeik asitin metilasyonu ile ferulik asit; kafeik ve *p*-kumarik asitin metilasyonu ile lignin oluşumu gerçekleşir. Hidroksisinnamik asit türevlerinin oluşması için hidroksisinnamoil-KoA ligazları ile katalizlenmiş hidroksisinnamat-KoA'ların oluşması gereklidir. Hidroksisinnamat-KoA'lar spesifik fenilpropanoid reaksiyonlarına girerler.



**Şekil 2.2.1.1.** Hidroksisinnamik asit, hidroksibenzoik asit ve flavonoid biyosentezi



**Şekil 2.2.1.1. (devamı)** Hidroksisinnamik asit, hidroksibenzoik asit ve flavonoidlerin biyosentezi; SA4H, sinnamik asit 4-hidroksilaz; KHS, kalkon sentaz; 4KL, 4-kumarat: koenzim A ligaz; FAL, fenilalanin amonialaz; Me, metil. (devam). (Haddock ve ark. 1982, Harborne 1988, Hahlbrock ve Scheel 1989, Maas ve ark. 1992, Bennet ve Wallsgrove 1994, Dixon ve Paiva 1995, Strack 1997)

Hidroksibenzoik asitlere özgü biyosentez aşamaları bitkilerde farklılık gösterir. Temel olarak hidroksibenzoik asitler; hidroksisinnamik asitlerin bozunması (Macheix ve ark. 1990, Strack 1997) ve gallik asit ile devam eden reaksiyonlar sonucu (Haddock ve ark. 1982) elde edilirler. Hidroksibenzoatlar genel olarak flavonoidlerin bozunması sonucu meydana gelirler (Strack 1997). Ayrıca hidroksibenzoik asitlerin metilasyonu ve hidroksilasyonu ile fenilalanin/hidroksisinnamat aşamalarında analog reaksiyonların meydana geldiği bilinmektedir (Gross 1981, Strack 1997).



### 2.2.2. Flavonollerin biyosentezi

Flavonoidlerin biyosentezindeki ana basamak üç molekül malonil-KoA ile *p*-kumaril-KoA'nın yoğunlaştırılması sonucu C<sub>15</sub> yapısına sahip kalkon oluşumudur (Harborne 1988, Strack 1997). Şimdiye kadar analiz edilen kalkon sentezleri için en iyi substrat 4-kumaril-KoA'dır. Kalkon sentezinden sonraki basamakta kalkon izomeraz ile katalizlenen kalkonun izomerleşerek (2S)-flavanon (naringenin) yapısına dönüşmesi meydana gelir (bkz. Şekil 2.2.1.1). Biyosentezde flavanonlar diğer flavonlara (apigenin, vs.) ve izoflavonlara (genistein, vs.) dönüştüğü için bu basamakta önem kazanırlar. Daha sonra flavanon 3-hidroksilaz ile katalizlenerek (2S)-naringenin bileşiği (2R,3R)-dihidrokamferol bileşiğine, (2S)-eriodiktiyol bileşiği ise (2R,3R)-dihidrokuersetin bileşiğine dönüşür (Britsch ve Grisebach 1985). Aynı zamanda enzim flavonol senteziyle de dihidrokamferol bileşiği kamferol yapısına dönüşür (Spribille ve Forkmann 1984).

Pek çok flavonoid bitki dokularına aktif olarak etki eden glikozit yapısındadır. Şeker yapısında çok sık bulunan glikoz, galaktoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz içeren yüzlerce farklı yapıda glikozit bulunmaktadır (Strack 1997). Glikoliz transferaz enzimi flavonoidlerin glikolizasyon reaksiyonunu katalizler. Glikozit oluşumu flavonoid konjugasyonuna bağlı değildir. Pek çok flavonoid açillenmiş şeker yapısı içerir. Bu açil grupları malonat gibi alifatik asitler veya hidroksisinnamatlardır (Strack 1997). Açillenme reaksiyonunda şeker yapısındaki hidroksil grubu ile asit grupları arasında esterleşme reaksiyonu meydana gelir (Markham 1989).

### 2.2.3. Bitkilerde flavonoid ve fenolik asitlerin işlevi

Fenolikler, hücre çeperi kadar büyük öneme sahiptirler. (Wallace ve Fry 1994). Genellikle hücre çeperi yapısının bir parçasını oluştururlar ve mikrobiyal etkilere karşı koruyucu görev yaparlar. Fenolik flavonoidlerin en önemli işlevi; antosiyanin, flavon ve flavonollerin çiçek ve meyve renklerine olan katkısıdır (Harborne 1994). Bu katkı, bitkilerin tozlaşması için böceklerin ve kuşların bitkilere olan ilgilerini etkilemektedir. Bununla birlikte çok iyi bilinen uçucu terpenoidler (toksik suda çözünen fenolikler):

basit fenolikler, hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler bitkilerde allelopatik bileşen olarak görev alırlar.

Flavonoidlerin ve fenolik asitlerin bitkilerde en önemli işlevi bitkinin savunma mekanizmasındaki aktif görevleridir (Britton 1983, Bennet and Wallsgrove 1994). Bitkinin aşırı UV ışığına maruz kalması, zarar görmesi (yaralanma) gibi durumlar fenolik bileşiklerin biyosentezine neden olmaktadır. Bu nedenle çevresel koşullar bitkilerde bulunan flavonoid ve fenolik asitlerin miktarını büyük ölçüde etkilemektedir. Fenolik bileşikler bitkilerdeki hastalık direnç mekanizmasına da katkıda bulunurlar. Bitki savunma mekanizması iki farklı şekilde gerçekleşir: doğrudan toksik etkiler ve toksik maddelerin lignin gibi hücre çeperi üzerinde aktif ve hızlı birikimi (Bennet ve Wallsgrove 1994). Mikrobiyal etkileşim sonucunda fenolik bileşikler daha küçük molekül kütleli bileşiklere dönüşürler. Bu bileşikler bitkilerde az miktarlarda bulunurlar ve herhangi bir dış tehdit anında öncü koruyucu görevi görürler. Aynı zamanda hidroksikumarinler ve hidroksisinnamik asitler de bitkiler için oldukça önem taşırlar. Bununla birlikte flavonoller de bitki savunma mekanizmasında görev alırlar (Bennet ve Wallsgrove 1994).

Fenolik metabolizmasında en çok araştırılan çevresel faktörlerden biri de ışıktır. Genellikle ışık flavonoidlerin (özellikle antosiyanin, flavon ve fenilalanin amonialaz) biyosentezini etkilemektedir (Britton 1983). Bu yüzden fenolik bileşiklerin fotosentez hücrelerine ulaşan ışık miktarını azalttığı düşünülebilir. Aynı zamanda fenolik bileşikler (antosiyanin, flavonol glikozit ve hidroksisinnamik asit) ve ışık arasındaki ilişkiyi gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Britton 1983). Yapılan bir çalışmada UV ile bozunma sonucu flavonoid (kamferol türevleri) sentezlerinin etkilendiği görülmüştür (Li ve ark. 1993, Lois 1994).

Patojenik organizmalar veya herbivorlar tarafından bitkinin zarar görmesi sonucu, bitki dokularında flavonoidler, fenolik asitler ve diğer fenilpropanoidlerin biyosentezinde artış görülmektedir (Britton 1983, Bennet ve Wallsgrove 1994). Yapılan bir çalışmada bitkinin stomasında oluşan zarar sonucunda kamferol ve kamferol glikozitlerin birikiminde azalma görülmüştür (Mo ve ark. 1992, Vogt ve ark. 1994). Flavonoidler,

bitkinin mikrobiyal enfeksiyonunu önlemektedirler. Ancak antosiyanin üretiminde artış olduğu zaman bitki dokuları da zarar görmektedir (Britton 1983). Klorojenik asit, alkil ferulat esterleri ve hücre çeperine bağlı fenolik esterler de bitki savunma mekanizmasında doğrudan etkili olabilirler (Halbrock ve Scheel 1989, Bernards ve Lewis 1992). Aynı zamanda basit fenolik asitlerin ve hücre çeperinde bulunan karmaşık tanninlerin de dış tehditlere karşı engelleyici etkileri vardır (Strack 1997).

### 2.3. *Lamiaceae* Familyası

Türkiye Florasında *Lamiaceae* familyası 45 cins 574 türle temsil edilmektedir. Endemizm oranının %44 olması da bu familyanın türkiyedeki yayılışının önemini göstermektedir (Davis ve Tan 1988) Ayrıca familya üyelerinin doğal antioksidan kaynağı olması, halk arasında yaygın olarak çay olarak kullanımlarının nedenini açıklamaktadır. Eski çağlardan günümüze kadar *Lamiaceae* familyası türleri halk arasında tıbbi ve baharat amacıyla kullanılmıştır. Dioscoridis'in *Materia Medica* adlı eserinde yer alan bitkilerden 40 kadarı *Lamiaceae* familyasına aittir (Baytop 2000). Familya ile ilgili 1978-1991 yılları arasında 2889 kimyasal içerikli çalışma tesbit edilmiştir (Richardson 1992). Familya türleri üzerinde yapılan kimyasal çalışmalarda 147 farklı flavonoid aglikon tesbit edilmiştir. Flavonoidlerin büyük çoğunluğu flavon (%60), bir kısmı flavonol (%16) ve flavanon (%20) dur. Ayrıca az miktarda dehidroflavonol (%2) ve kalkon (%2) bulunmaktadır (Tomas-Barberan ve Gil 1992) Aglikon ve glikozitlerin *Lamioideae* ve *Nepetoideae* alt familyalarına dağılımı Çizelge 2.3.1'de gösterilmiştir.

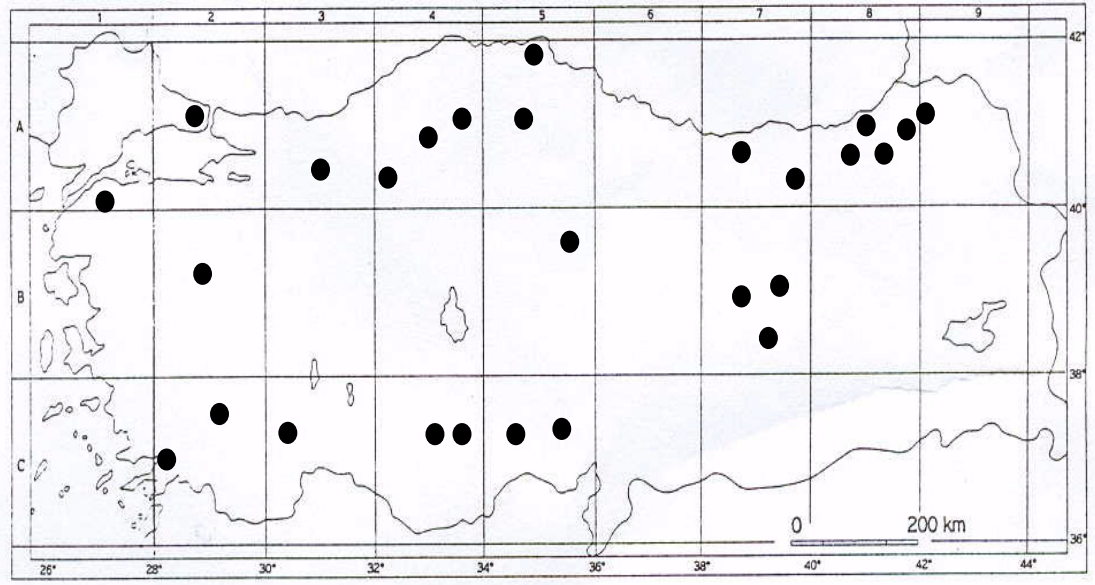
*Lamiaceae* familyasının zengin fenolik bileşiklere sahip önemli bir kaynak olduğu bilinmektedir (Tada ve ark. 1996, Kovatcheva ve ark. 1996, Morimoto ve ark. 1994, Sumaryono ve ark. 1991, Bertelsen ve ark. 1995). *Lamiaceae* familyasında bulunan en yaygın cinsler şunlardır: *Salvia* (Adaçayı), *Rosmarinus* (biberiye), *Lavandula* (lavanta), *Thymus L.*(kekik), *Mentha L.* (nane), *Sideritis* (Dağ çayı) .

**Çizelge 2.3.1.** Aglikon ve glikozitlerin *Lamioideae* ve *Nepetoideae* alt familyalarına dağılımı

Kimyasal Bileşen/ Alt Familya	Aglikon		Glikozit	
	<i>Lamioideae</i> (%)	<i>Nepetoideae</i> (%)	<i>Lamioideae</i> (%)	<i>Nepetoideae</i> (%)
Flavon	88	97	80	90
Flavonol	35	38	55	34
Flavanon	11	41	15	38
Dehidroflavonol	5	14	0	3
Kalkon	5	7	0	3

### 2.3.1. *Prunella* L.

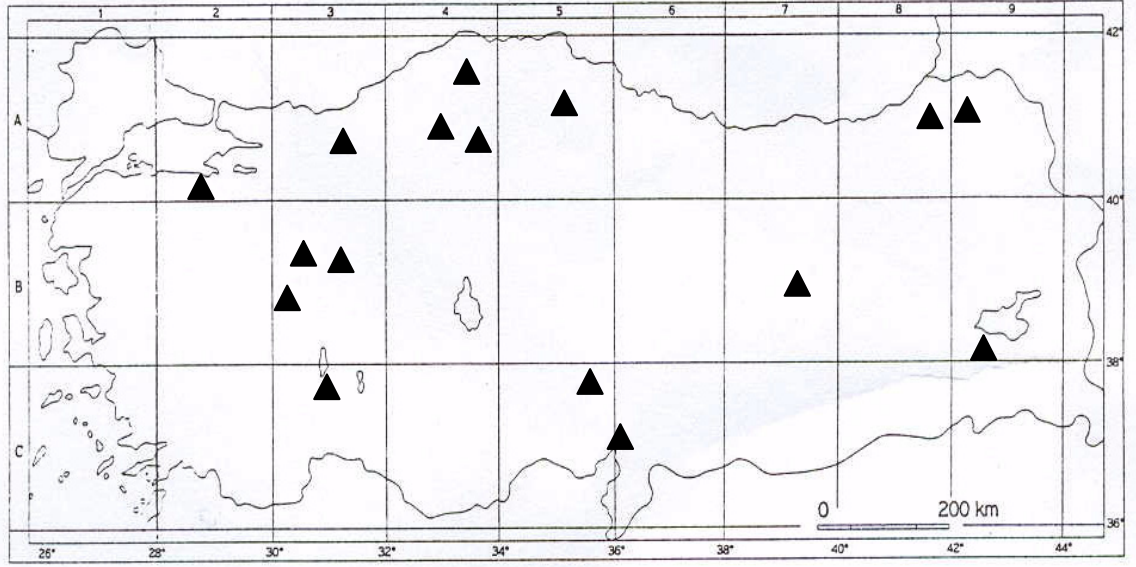
*Lamiaceae* familyasında yer alan *Prunella* L. türleri Avrupa, Akdeniz havzası, Kuzey Afrika, Rusya, Doğu Asya, Amerika ve Avustralya olmak üzere dünyada çok geniş bir yayılış göstermektedir (Ahmed ve Ezer, 2008). Bunun yanında *Prunella* L. cinsinin Kuzey Batı Afrika, Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da yayılış gösteren 9 türü bulunmaktadır (Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990, Edmonson 1982). Ülkemizde ise Türkiye Florası kayıtlarına göre 3 türü yayılış göstermekte olup *P.grandiflora* şüpheli kayıt olarak yer almaktadır (Edmonson 1982). Fakat Prof.Dr. Hulusi Malyer ve arkadaşları tarafından Türkiye'de varlığı belirlenen *Prunella grandiflora* L da çalışmamıza katılmıştır. Böylece *Prunella* L. cinsinin; *Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella orientalis* Bornm., ve *Prunella grandiflora* L. olmak üzere 4 türü saptanmış olmaktadır. Şekil 2.3.1.1 (*Prunella vulgaris* L.), 2.3.1.3 (*Prunella laciniata* (L.) L.), 2.3.1.5 (*Prunella orientalis* Bornm.) ve 2.3.1.7'de (*Prunella grandiflora* L.) Türkiye'deki yayılış haritası verilmiştir. Ayrıca Şekil 2.3.1.2 (*Prunella vulgaris* L.), 2.3.1.4 (*Prunella laciniata* (L.) L.), 2.3.1.6 (*Prunella orientalis* Bornm.) ve 2.3.1.8'de (*Prunella grandiflora* L.) *Prunella* türlerinin fotoğrafları gösterilmiştir.



Şekil 2.3.1.1. *Prunella vulgaris* L. Türkiye'deki yayılış haritası



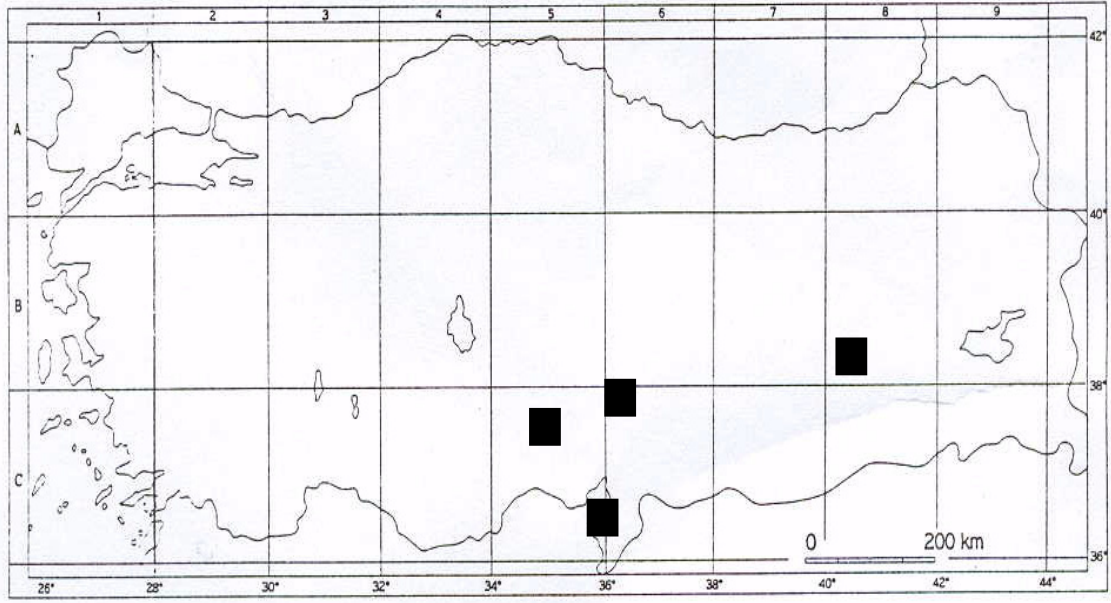
Şekil 2.3.1.2. *Prunella vulgaris* L. (Tuncay Dirmenci)



Şekil 2.3.1.3. *Prunella laciniata* (L.) L. Türkiye'deki yayılış haritası



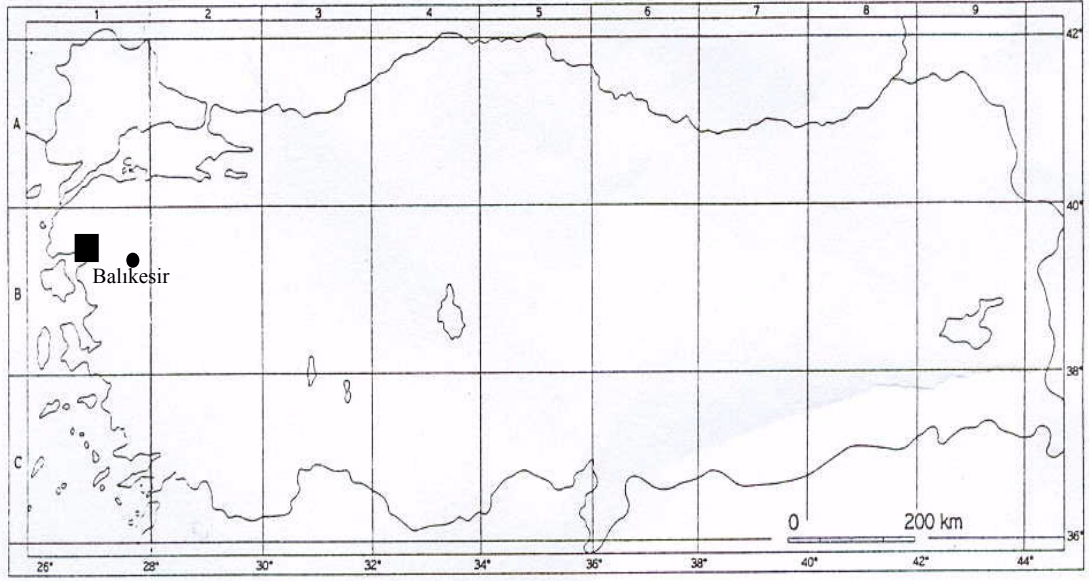
Şekil 2.3.1.4. *Prunella laciniata* (L.) L. (Tuncay Dirmenci)



Şekil 2.3.1.5. *Prunella orientalis* Bormm. Türkiye'deki yayılış haritası



Şekil 2.3.1.6. *Prunella orientalis* Bormm. (Tuncay Dirmenci)



Şekil. 2.3.1.7. *Prunella grandiflora* Türkiye'deki yayılış haritası



Şekil 2.3.1.8. *Prunella grandiflora* L. (Tuncay Dirmenci)



*Prunella* L. türleri arasında özellikle *Prunella vulgaris* L., boğaz ağrılarını hafiflettiği, yaraların hızlı iyileşmesini sağladığı için 17.yy'dan beri Avrupa'da kullanılan geleneksel ilaçlar içinde önemli bir yere sahiptir (Matthiolus 1626). Fenolik bileşikler açısından oldukça zengin olduğu düşünülen *Prunella* L. türleri üzerinde yapılan çalışmalarda; bu türün antienflamatuvar (Yeşilada ve Sezik 1990, Psotova ve ark. 2003), antiviral (Zheng 1988, Yao ve ark. 1992, Ryu ve ark. 1992, Yamasaki ve ark. 1998, Xu ve ark.1999, Kageyama ve ark. 2000, Liu ve ark. 2002, Chiu ve ark. 2004, Nolkemper ve ark. 2006), antikanser (Lee ve Lin 1988, Lee ve ark. 1988, Zhang ve ark. 2006), antioksidan (Liu ve Ng 2000, Psotova ve ark. 2005, Skottova ve ark. 2004, Psotova ve ark. 2006) ve antihiperglisemik (Zheng ve ark. 2007) aktivite özelliğine sahip olduğu bulunmuştur.

### **2.3.2. *Prunella* L. türlerinde bulunan flavonoidler ve fenolik bileşikler**

*Prunella* L. türleri üzerinde bugüne kadar yapılan fitokimyasal çalışmaların sonucunda izole edilen ve yapıları aydınlatılan fenolik bileşikler ve flavonoidler bulunmaktadır. Bazı *Prunella* L. türleriyle yapılan çalışmalarda bitkinin toprak üstü kısımlarında ve çiçeklerinde bulunan flavonoidler ve fenolik bileşikler Çizelge 2.3.2.1'de özetlenmiştir.

Bulunan sonuçlara göre izokuersetin *Prunella laciniata* (L.) L. ve *Prunella grandiflora* L. ve *Prunella vulgaris* L. türlerinde, rutin ise sadece *Prunella vulgaris* L. ve *Prunella grandiflora* L. türünde bulunan başlıca flavonoid olarak belirlenmiştir. Hiperozit bileşiğinin ise bütün *Prunella* L. türlerinde eser miktarda da olsa bulunduğu tespit edilmiştir (Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990). Yapılan bir çalışmada *Prunella vulgaris* L. türünde bulunan flavonoid miktarı %0,14–0,19 olarak tayin edilmiştir (Dmitruk ve ark. 1985).

*Prunella vulgaris* L. ve *Prunella grandiflora* L. türlerinden elde edilen metanol ekstraktlarında *cis* ve *trans* kafeik asit tespit edilmiştir (Sendra 1963). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle *Prunella vulgaris* L. türünde kuru örnekte rosmarinik asit %25,7; kafeik asit %0,32 bulunmuştur (Skottova ve ark. 2004, Psotova ve ark. 2003). *Prunella vulgaris* L. türünde bulunan fenolik bileşiklerden rosmarinik asit

başlıca fenolik bileşik olarak tespit edilmiştir (Lamaison ve ark. 1991). Buna karşılık klorojenik asit miktarı *Prunella vulgaris* L. türünde %2, *Prunella laciniata* (L.) L. türünde ise %0,1' den az bulunmuştur (Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990). Yapılan çalışmalarda *Prunella vulgaris* L. türünde %7,9–8,45; *Prunella laciniata* (L.) L. türünde %10,15–11,52 ve *Prunella grandiflora* L. türünde ise %3,95–4,31 oranında tannin tespit edilmiştir (Natherova ve Rezacova 1972).

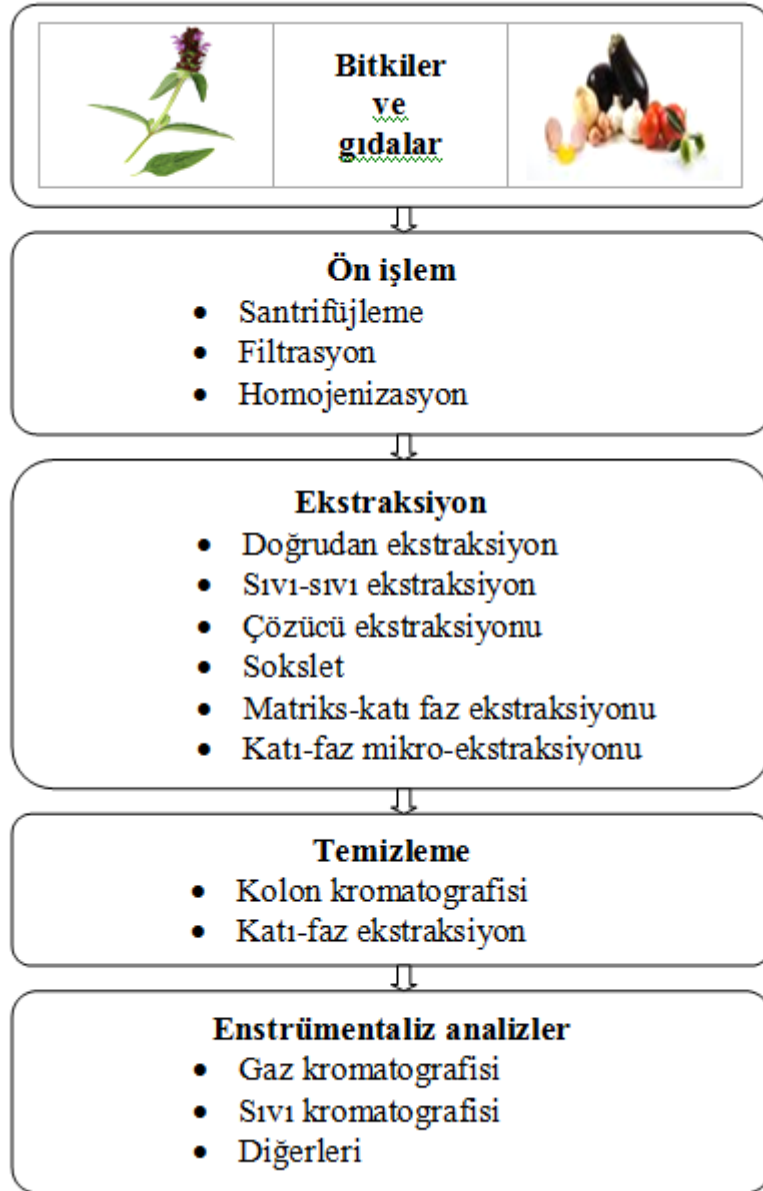
*Prunella vulgaris* L. yapraklarından elde edilen sabit yağın bileşiminde %7 oleik asit, %9 linoleik asit, %28 miristik asit, %25 palmitik asit, %15 stearik asit ve %13 laurik asit bulunmuştur (Jain ve Saxena 1984). *Prunella vulgaris* L.'in uçucu yağının 1,8-sineol yönünden zengin olduğu bulunmuştur. Bu bitkinin uçucu yağında 14 bileşik tespit edilmiş, ana bileşik olarak tayin edilen hegzadekanoik asitin %17,16 oranında bulunduğu belirtilmiştir (Wang ve ark. 1994).

**Çizelge 2.3.2.1.** *Prunella* L. türlerinde bulunan flavonoidler ve fenolik bileşikler.

<b>Bileşik adı</b>	<b><i>Prunella</i> L. türü</b>	<b>Kaynak</b>
<b>Flavonoidler</b>		
Kamferol	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Saxena ve Archana 1984, Lamaison ve ark. 1991
Astragalin (Kamferol-3-glikozit)	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Zhang ve Yang 1995
Kuersetin	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Saxena ve Archana 1984, Lamaison ve ark. 1991, Zhang ve Yang 1995
İzokuersetin (Kuersetin-3-glikozit)	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Dmitruk ve ark. 1985, Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990
	<i>Prunella grandiflora</i> L.	Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990
	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L.	
Hiperosit (Kuersetin-3-galaktozit)	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Dmitruk ve ark. 1985, Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990
	<i>Prunella grandiflora</i> L.	Sendra 1963, Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990
Rutin (Kuersetin-3-glikoramnozid)	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Dmitruk ve ark. 1985, Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990, Lamaison ve ark. 1991
	<i>Prunella grandiflora</i> L.	Sendra 1963
Luteolin Homoorientin (Luteolin-6-C-glikozit; Izoorientin) Sinarosit (Luteolin 7-O-D-glikozit)	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Dmitruk ve ark. 1987
<b>Fenolik bileşikler</b>		
Rosmarinik asit	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Lamaison ve ark. 1991, Wang ve ark. 2000, Psotova ve ark. 2003, Skottova ve ark. 2004
Kafeik asit	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Sendra 1963, Lamaison ve ark. 1991, Psotova ve ark. 2003, Skottova ve ark. 2004
<i>p</i> -kumarik asit	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Wang ve ark. 2000
Klorojenik asit	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Lamaison ve Petitjean-Freytet 1990
	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L.	
Taninler	<i>Prunella vulgaris</i> L. <i>Prunella laciniata</i> (L.) L. <i>Prunella grandiflora</i> L.	Natherova ve Rezacova 1972

## 2.4. Analitik Yöntemler

Günümüzde bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin analizi için çok sayıda çalışma yapıldığını görmekteyiz. (van Sumere ve ark. 1978, Waterman ve Mole 1994, Harborne 1998). Bu çalışmalardan da görüldüğü gibi fenolik bileşiklerin analizinde ilk basamağı ekstraksiyon işlemi oluşturmaktadır (Şekil 2.4.1).



**Şekil 2.4.1.** Bitkilerde ve gıdalarda bulunan flavonoidlerin tayin yöntemleri (de Rijke ve ark. 2006).

Ekstraksiyon işlemi bitkinin türüne, tayin edilmek istenen fenolik bileşiklere ve kullanılan analitik yönteme göre değişim göstermektedir (Lee ve Widmer 1996). Örnek hazırlama işleminde bitkinin ezilmesi, öğütülmesi veya preslenmesi bitkinin yüzey alanının artmasına neden olur, böylece kullanılan ekstraksiyon çözeltisi ile bitkinin daha çok etkileştiği görülür. Aynı zamanda fenolik bileşiklerin glikozitleri ve esterleri analiz edilirken örnek hazırlama basamağında alkali, asit ve enzimatik hidroliz yapılmaktadır (Waterman ve Mole 1994).

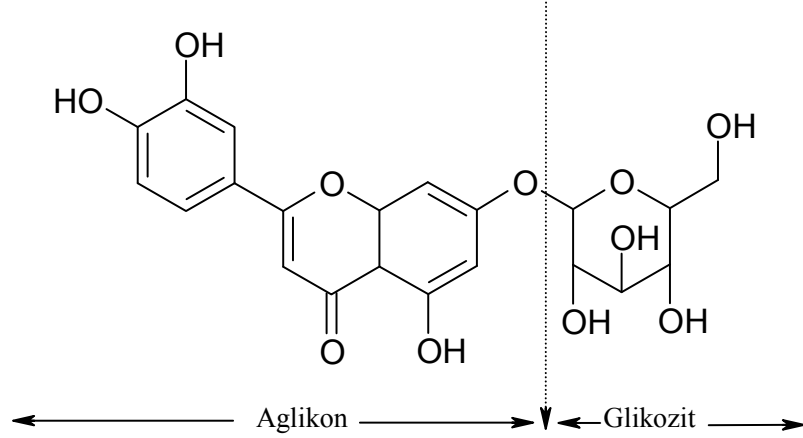
#### **2.4.1. Ekstraksiyon ve hidroliz işlemleri**

Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı en basit yapıdan en karmaşık yapıya (fenolik asitler, fenilpropanoidler, antosiyaninler ve taninler) kadar değişim göstermektedir. Bu fenolik bileşiklerin karbonhidratlar, proteinler ve bitkinin diğer bölümleri ile oluşturdukları kompleksleri de bulunmaktadır. Bu nedenle bitkiden elde edilen ekstraktlar çözücü karışımlarında çözünebilen farklı sınıf fenolik bileşikleri içerebilmektedir. Fenolik bileşiklerin analizi sırasında ekstrakta bulunması istenmeyen vakslar, yağlar, terpenler ve klorofiller gibi bileşikler de olabilir. Bu istenmeyen bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması için katı faz ekstraksiyon tekniği ve asite dayalı fraksiyonlama işlemleri yapılabilir. Fenolik bileşiklerin çözünürlüğü çözücünün polaritesine, fenoliklerin polimerizasyon derecesine ve fenoliklerin diğer bileşiklerle olan etkileşimine göre değişir. Metanol, etil alkol, aseton, su, etil asetat, az miktarda kullanılan propanol, dimetilformamid ve bunların birleşimleri fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılır (Antolovich ve ark. 2000).

##### **2.4.1.1. Flavonoller**

Flavonoidler genellikle bitkilerden metanol, etil alkol, su ve birleşimleri kullanılarak ekstrakte edilirler. Ama bazı durumlarda çözücülerin asitlendirilmesi gerekebilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile yapılan analizlerde flavonoid glikozitlerin aglikonlara (Şekil 2.4.1.1.1) dönüşebilmesi için azot ortamında ekstraktlar HCl ile muamele edilirler. Yapılan bir çalışmada flavonoidlerin bitkiden %62,5 (h/h) su-metanol karışımı kullanılarak ekstrakte edildiği görülmektedir. 6 M HCl ile 1:4

oranında asitlendirilen ekstraktın azot gazı ortamında 90 °C'de 2 saat tutulmasıyla flavonoid glikozitlerin ekstraksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Mattila ve ark. 2000). Dondurulmuş meyve ve sebzelerden kateşin ekstraksiyonu için su-metanol (%70–90, v/v) çözücü karışımları da kullanılmıştır (Arts ve ark 2000).



**Şekil 2.4.1.1.1.** Flavonoid glikozitlerden luteolin-7-O-glikozit yapısı.

Flavonol glikozitlerin referans maddeleri olmadığı için kantitatif analizlerini yapmak zorlaşır. Ama yapılan çalışmalarda meyvelerde 30 farklı flavonol glikozit tayin edilmiştir (Macheix ve ark. 1990). Yapılan bir çalışmada gıdalarda bulunan flavonol glikozitlerin aglikonlarına dönüşmesini sağlayan hidroliz işleminin kolaylıkla kullanıldığını görmekteyiz (Hertog 1994, Robards ve Antolovich 1997). Glikozitlerin asit/alkali hidroliz hızları kullanılan asit/baz gücüne, şekerin yapısına ve şekerde bulunan flavonoid çekirdeğinin pozisyonuna göre değişir. Glukuronitler bağ kopmasıyla sonlanan asit hidrolizinde glikozitlere göre daha dayanıklıdır (Hertog 1994).

Flavonoid O-glikozitlerin monosakkaritlerle arasındaki bağın kopmasına dayanan enzimatik hidroliz tekniği de hızlı sonuca ulaşmamızı sağlayan bir diğer hidroliz tekniğidir. İnsan plazmasında bulunan bazı flavonollerin  $\beta$ -gluronidaz ve sülfataz enzimleri kullanılarak hidrolizi gerçekleştirilmiştir (Erlund ve ark. 1999).

#### 2.4.1.2. Fenolik bileşikler

Bitki matriksinden fenolik asitlerin ekstraksiyonu sırasında en çok kullanılan organik çözücüler; etil asetat (Azar ve ark. 1987), dietil eter (Fernández de Simón ve ark. 1990,1992), metanol ve sudur (Kuninori ve Nishiyama 1986, Torres ve ark. 1987, McRae ve ark. 1990).  $\beta$ -glukozidaz (Kanes ve ark. 1993) ve hidrosinnamoil-kuinat esteraz (Goupy ve ark. 1990) enzimleri kullanılarak da fenolik asitlerin hidrolizi yapılabilmektedir. Bununla birlikte fenolik bileşiklerin analizinde en çok kullanılan hidroliz teknikleri asit ve alkali hidrolizdir (Lee ve Widmer 1996).

Asit hidrolizi 2 saat veya daha fazla sürede örneğin HCl ile ısıtılması sonucu yapılabilir (Kuninori ve Nishiyama 1986). Benzoik asit ve sinamik asit esterlerinin hidrolizi alkali ortamda oda koşullarında 4–24 saat süresince (Seo ve Morr 1984) veya azot gazı ortamında 60 °C’de 90 dk boyunca NaOH ile muamele edilerek yapılmıştır (Kuninori ve Nishiyama 1986). Yapılan bir çalışmada fenolik bileşiklerin (ellagik asit, hidroksibenzoik asit, hidroksisinnamik asit, flavonol ve flavan-3-ol) asit ve alkali hidroliz teknikleri karşılaştırılmıştır. Asit hidrolizinden elde edilen örnekteki fenolik bileşik miktarı alkali hidrolizden elde edilen örnek miktarına eşit bulunmuştur (Rommel ve Wrolstad 1993).

Krygier ve ark. (1982) oda sıcaklığında metanol-aseton-su (7:6:7, h/h/h) karışımlarını kullanarak yağ tohumlarından serbest ve esterleşmiş fenolik asitleri izole etmişlerdir. Aynı zamanda bitkinin sulu fazı asitlendirildikten sonra fenolik asitler dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Sulu fazda bulunan esterleşmiş fenolik bileşiklerin serbest hale geçmesi için ekstrakt 4 M NaOH ile bazik yapılmıştır. Daha sonra elde edilen bazik ekstrakt dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Sırasıyla metanol-aseton-su ile yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen kalıntı, çözünmeyen bağlı fenolik asitleri serbest hale geçirmek için azot gazı ortamında 4 M NaOH ile muamele edilmiştir. Yapılan bu çalışmada alkali ortamda yapılan hidroliz ile hidroksisinnamik asit türevleri miktarlarında kayıplar olduğu belirtilmiştir. Bununla beraber bir başka çalışmada ortama askorbik asit (%1) ve etilendiamintetraasetik asit (10 mM) eklenmesi ile fenolik asitlerin bozunmasının engellenebileceği vurgulanmıştır (Nardini ve ark. 2002). Fenolik

bileşiklerin ekstraksiyon işlemi için farklı miktarda su içeren etil alkol, aseton ve kloroform çözücü karışımları da kullanılmaktadır (Antolovich ve ark. 2000, Kozłowska ve ark. 1983). Hücre çeperine bağlı fenolik bileşikler için de farklı alkali hidroliz yöntemleri geliştirilmiştir (Hartley ve Morrison 1991, Rodriguez-Arcos ve ark. 2002). İlk olarak hücre çeperinden izolasyon yapılmıştır (Parker ve Waldron 1995). Daha sonra sırasıyla 0,1 M NaOH (1 saat, 25 °C), 0,1 M NaOH (24 saat, 25 °C), 1 M NaOH (24 saat, 25 °C), ve 2 M NaOH (24 saat, 25 °C) ile ekstrakte edilmiştir. Her bir alkali ekstrakt pH<2 olacak şekilde HCl ile asitlendirilip sonra da serbest fenolik bileşikleri elde etmek için üç kez etil asetat ile muamele edilmiştir.

Bütün bu çalışmalardan da görülmektedir ki fenolik bileşiklerin asit ve alkali hidrolizi için farklı miktarlar, süreler ve sıcaklıklar kullanılmaktadır. Genellikle bitkilerde veya meyvelerde bulunan fenolik bileşiklerin kantitatif tayininde ekstraksiyon ve hidroliz şartları her zaman optimize edilmelidir (Lee ve Widmer 1996).

#### **2.4.2. Kromatografik teknikler**

Fenolik bileşiklerde bulunan farklı yapısal grupları tayin etmek için kullanılan yöntemlerin dayandığı temel ilkeler birbirinden farklıdır. Gaz kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi teknikleri fenolik bileşiklerin hem ayrılması hem de kantitatif tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal antioksidan kaynaklı ve fenolik madde içeriği yüksek *Lamiaceae* familyası ile yapılan fenolik madde analizleri çalışmalarında gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC-MS) (Proestos ve ark. 2006, Gherman ve ark. 2000, Fiamegos ve ark. 2004) ve yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (HPLC-MS) (Kivilompolo ve ark. 2007, Zgórka ve Glowniak 2001, Señoráns ve ark. 2000, Dorman ve ark. 2003, 2004, Dastmalchi ve ark. 2007, Areias ve ark. 2001, Koşar ve ark. 2005) tekniklerinin başarılı bir şekilde kullanıldığı görülmektedir.



### 2.4.2.1. Flavonoller

1950'li ve 1960'lı yıllarda flavonoidlerin analizi için kâğıt kromatografisi teknikleri geliştirilmiştir (Markham 1982, Robards ve Antolovich 1997). Ancak 1970'li yıllarda kâğıt kromatografisi yerini, pek çok bileşiğin aynı anda analizi için ucuz ve kullanışlı teknik olan ince tabaka kromatografisine bırakmıştır (Robards ve Antolovich 1997, Harborne 1998). Bu tekniklerde kullanılan durgun faz ve çözücü seçimi flavonoid ve flavonoid sınıflarına göre değişmektedir. Hidrofilik flavonoid olan flavonoller, poliamid ve mikrokristal selüloz durgun faz kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile ayrılmışlardır (Robards ve Antolovich 1997). İnce tabaka kromatografisi günümüzde halen flavonoid sınıflarının tayininde kullanılmaktadır (Lee and Widmer 1996).

Flavonoidler ve diğer fenolik bileşiklerin gaz kromatografisi ile yapılan analizindeki tek dezavantaj bileşiklerin sahip olduğu sınırlı uçuculuk özellikleridir. Bununla birlikte siyah çayda bulunan flavonoidlerin analizi GC-MS ile yapılmıştır (Finger ve ark. 1991). Gaz kromatografisi tekniğinin avantajı izomer bileşiklerin kütle dedektörü kullanılarak oluşan parçalanma ürünlerine göre tayin edilebilmesidir (Mouly ve ark. 1993, Schmidt ve ark. 1994).

Flavonoidlerin analizinde kullanılan HPLC de son 20 yılda geliştirilen diğer bir tekniktir. Bu teknik, bitkilerde bulunan flavonoidlerin analizine başka bir boyut kazandırmıştır. HPLC tekniğinin sahip olduğu bazı avantajlar vardır:

- Diğer kromatografik tekniklerle karşılaştırıldığında flavonoid karışımların çözünürlüğü arttırılmıştır.
- Tek analiz ile hem kalitatif hem de kantitatif tayin yapılabilmektedir (Harborne 1988, Markham 1989).

Yapılan çalışmalarda normal-faz kromatografisinin flavonoidlerin (flavon, flavonol, flavanon aglikon) ayrılmasında kullanıldığı belirtilmiştir (Galensa ve Herrmann 1980). Bu çalışmada flavonoid asetatları LiChrosorb Si60 kullanılarak benzen-asetonitril, benzen-etil alkol ve izooktan-etil alkol-asetonitril çözücü karışımları ile izokritik olarak 312 ve 270 nm de tayin edilmişlerdir (vande Castele ve ark. 1983). Ters-faz

kromatografisi de flavonoller ve flavonoid gruplarının ayrılmasında tercih edilir. Ters-faz kromatografisinde genellikle durgun faz olarak C<sub>18</sub> kolon (3–5 µm), mobil faz olarak da su, metanol ve asetonitril ve bunların birleşimleri kullanılır. Flavonoidlerin ve diğer fenolik bileşiklerin ayrılmasını sağlamak için mobil faz içine küçük miktarlarda da olsa asetik asit, formik asit ve fosfat tamponları katılmaktadır (Lamuela-Raventós ve Waterhouse 1994, Merken ve Beecher 2000).

#### **2.4.2.2. Fenolik bileşikler**

Fenolik asitlerin kantitatif analizi için yapılan ince tabaka kromatografisi uygulamalarında durgun faz olarak selüloz ve silika tabakalar, mobil faz olarak hidrokarbon karışımları (toluen, diokzan ve benzen) ve polar organik modifiyerler olarak aseton, butanol, etil alkol ve asetik asit kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Azar ve ark. 1987, Regnault-Roger ve ark. 1987, Srisuma ve ark. 1989, Agbor-Egbe ve Rickard 1990). HPLC ile yapılan analizlerde; tayin edilen maddelerin, durgun faz tarafından adsorbe edildikten sonra, uygun çözücü karışımları kullanılarak iyi bir ayrımı sağlanabilir. Bu nedenle örnek ekstraktının görüntülenebilmesi için ince tabaka kromatografisi, HPLC'ye göre daha avantajlıdır (Lee and Widmer 1996).

Bitkilerde bulunan fenolik asitlerin analizi için GC ve HPLC teknikleri kullanılmaktadır. Flavonollerin tayinlerinde olduğu gibi sıvı kromatografisi tekniklerinden ters-faz sıvı kromatografisi tekniği daha çok tercih edilmektedir. HPLC tekniklerinde kullanılan çözücüler su, metanol ve asetonitrildir. Mobil fazın pH'ı ve iyonik şiddeti, protonlama ve çözünmeye bağlı olarak fenolik bileşiklerin alıkonmalarını etkilemektedir (Marko-Varga ve Barcelo 1992). Örneğin iyonlaşmasını arttırılabilmek için yapılan pH değişimleri sonucu ters-faz ayırında alıkonma süresi azalır. Bu nedenle; fenolik ve karboksilik asitlerin iyonlaşmasını baskılamak ve çözünürlüğü arttırmak için asetik asit (%2–5), formik asit, fosforik asit ve trifloroasetik asit (%0,1) mobil faza eklenir.

### 2.4.3. Flavonollerin ve fenolik asitlerin belirlenmesi ve tayini

Fenolik bileşikler UV bölgede absorpsiyon yaptıkları için, HPLC ile analizlerinde kullanılan en yaygın dedektörler UV ve UV-görünür bölge dedektörleridir (Lee and Widmer 1996, Robards and Antolovich 1997). Fenolik bileşik sınıfları farklı dalga boylarında maksimum absorpsiyon yaptıkları için analizleri sırasında tek dalga boyu kullanımı yeterli değildir (Delage ve ark. 1991). Pek çok benzoik asit türevi 246–292 nm aralığında maksimum absorpsiyona sahiptir. Ancak gallik asit ve siringik asit sırasıyla 271 ve 275 nm’de absorpsiyon yapmaktadırlar (Torres ve ark. 1987). Hidroksisinnamik asitler, UV bölgede iki farklı dalga boyu aralığında (225–235 nm, 290–330 nm) maksimum absorpsiyona sahiptirler (Ribereau-Gayon 1972). Sinnamik asit türevleri, 254 nm’de yüksek absorpsiyon yapabilen benzoik asit türevlerinin hiçbir girişim etkisi olmadan 320 nm’de tayin edilebilmektedir. Bununla birlikte hem sinnamik hem de benzoik asitlerin tayini için alternatif olabilecek diğer dalga boyu da 280 nm’dir (Pussayanawin ve Wetzel 1987). Flavonol aglikonlarının tayini 350–370 nm aralığında, flavan-3-ol ve flavonol glikozitlerin tayini de 280 nm dalga boyunda yapılmaktadır (Robards ve Antolovich 1997).

Flavonoidlerin ve fenolik asitlerin analizinde diod serili dedektörlerinin fazla kullanılmasının sebebi; bu dedektörler ile ara vermeden enjeksiyon yapıp on-line spektrum elde edilebilmesidir (Justesen ve ark. 1998). Bu durum fenolik bileşiklerin spektroskopik analizlerinde kolaylık sağlamaktadır. UV dedektörlerinin tek dezavantajı floresans dedektörler kadar duyarlı ve seçici olmamasıdır. Bununla birlikte floresans dedektörler, fenolik bileşiklerin tayinlerinde çok yaygın kullanım alanına sahip değildirler (Lee and Widmer 1996).

Düşük potansiyel değerlerinde yükseltgenme-indirgenme özelliği olan bileşikler için elektrokimyasal dedektörler çok duyarlıdır. Az miktardaki fenolik bileşiklerin tayinlerinde UV dedektörler ile karşılaştırıldığında, elektrokimyasal dedektörler artan bir öneme sahiptirler (van Sumere 1989, Akasbi ve ark. 1993). Elektrokimyasal dedektörler, sebzelerde bulunan flavonoller ve fenolik asitlerin tayinlerinde başarılı bir şekilde kullanılmışlardır (Chiavari ve ark. 1988). HPLC-MS, uçucu olmayan fenolik

bileşiklerin tayinleri için kullanılan hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntemde iyonlaşma basamağından önce arayüzey sistemlerinin kullanılması ile sıvı mobil fazın ortamdaki uzaklaştırılması sağlanır. Yapılan çalışmalarda çayda (Kiehne ve Engelhardt 1996) ve tıbbi bitkilerde (Pietta ve ark. 1994) bulunan flavonol glikozitlerin tayinlerinde termosprey sıvı kromatografisinin kullanıldığı görülmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-elektrosprey iyonlaşma-kütle spektrometrisinin (HPLC-ESI-MS) kullanımı; büyük, kararsız ve oldukça polar olan bileşiklerin tayinlerinde kolaylık sağlamaktadır (Careri ve ark. 1998). Çayda bulunan flavonoidlerin tayinlerinde HPLC-ESI-MS kullanılmıştır (Poon 1998). Flavonoidlerin tayinlerinde atmosferik basınç iyonlaşma-kütle spektrometrisi (API-MS) teknikleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Justesen ve ark. 1998).

Yapılan pek çok çalışmada standart ve referans maddelerin yardımıyla örnekte bulunan flavonoidlerin tayini için MS ve UV dedektörlerin birlikte kullanıldığını görülmektedir. Standartı olmayan bilinmeyen maddelerin analizi için ikili kütle spektrometrisi (MS/MS veya MS<sup>n</sup>) kullanılmaktadır. Kullanılan bu iki tekniğin temelini yapısal karakterizasyon oluşturur. Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) analizlerinde atmosferik basınç-elektrosprey iyonlaşma (API/ESI)-negatif modunun kullanılması duyarlılığı arttırmaktadır. Bununla birlikte API/ESI-pozitif modunun kullanılması da yaygındır. Günümüzde flavonoidlerin analizinde GC-MS kullanımının yaygın olmasında rağmen flavonoidlerin uçuculuk özellikleri analizleri sınırlı hale getirmektedir. Flavonoidlerin uçuculuğunun az olması halinde türevlendirme yapılması gerekmektedir. Türevlendirme işlemi zaman alıcı bir işlemdir. Bu yüzden flavonoidlerin analizinde LC-MS, GC-MS'e göre daha kullanışlı, hızlı ve duyarlı bir tekniktir. Çizelge 2.4.3.1'de LC-MS ile yapılan bazı çalışmalar özetlenerek gösterilmiştir.

**Çizelge 2.4.3.1.** LC-MS ile yapılan flavonoid analizleri

<b>Örnek</b>	<b>Flavonoid</b>	<b>İyonlaşma modu</b>	<b>Mobil faz</b>	<b>Kaynak</b>
<i>Genista tinctora</i>	16 tane flavon- ve izoflavon-glikozit(-malonatlar) ve aglikonlar	ESI(-)	Asetonitril, asetik asit	Ma ve ark. 2003
<i>Leguminosae</i> (4 tür)	İzoflavon- ve flavonol-glikozit-(di)malonatlar ve flavonol (di)glikozitler	APCI(-)	Metanol, amonyum format	de Rijke ve ark. 2004
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Vogonin-5-O-glikozit, vogonosit, baikalin, vogonin, norvogonin, kirisin-6-C-arabinoz-8-C-glikoz, kirisin-6-C-glikoz-8-C-arabinoz	ESI(-)	Asetonitril, amonyum asetat	Wu ve ark. 2004
<i>Ginkgo biloba</i> tabletleri	Rutin, kuersitrin, kuersetin, kamferol, izoramnetin, kuersetin-glikozit	ESI(-)	Asetonitril, formik asit	Dubber ve ark. 2005
<i>Hypericum perforatum</i> , <i>Rhodiola rosea</i> , kırmızı üzüm şarabı, portakal suyu, yeşil çay	50 tane flavonol, flavanon, flavon, kateşinler ve antosiyaninler	ESI(+)	Metanol, formik asit	Tolonen ve Uusitalo 2004
Kırmızı yonca	49 tane izoflavon-glikozit-malonatlar ve -asetatlar, glikozitler ve aglikonlar	ESI(+)	Asetonitril, su	Klejdus ve ark. 2001
<i>Helichrysum stoechas</i>	6 tane kalkon, flavonol ve flavanon	APCI(±)	Asetonitril, amonyum format	Carini ve ark. 2001

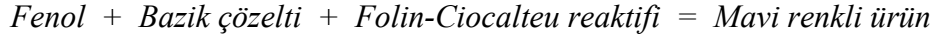
#### **2.4.4. Spektroskopik teknikler**

Bitkilerin toplam fenol, toplam antosiyanin ve antioksidan aktivite tayinleri yaygın olarak spektroskopik teknikler kullanılarak yapılmaktadır.

##### **2.4.4.1. Toplam fenol tayinleri**

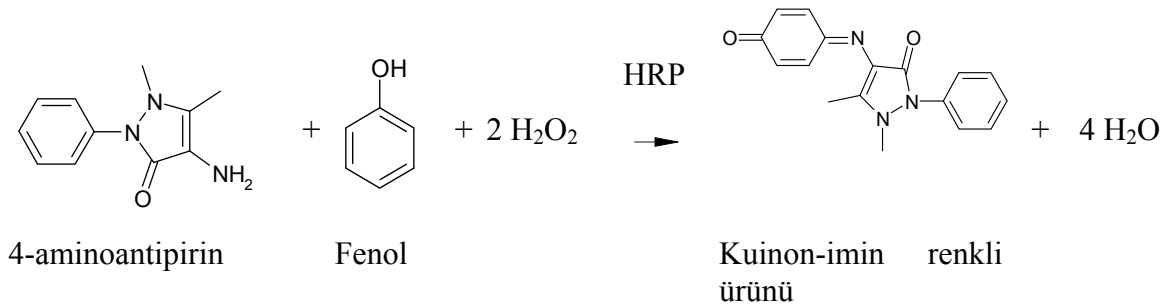
Bitkilerin toplam fenol içerikleri, bitkinin antioksidan özelliğinin belirlenmesinde önemli bir parametredir. Bitki ve gıda matrislerinde yapılan toplam fenol tayinlerinde

yüksek performanslı sıvı kromatografisi yanında Folin-Ciocalteu yöntemi de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde fenolik bileşikler arasında hiçbir fark olmaksızın kolorimetrik yükseltgenme/indirgenme ölçümleri gereklidir. Folin-Ciocalteu reaktifi ile fenolik bileşikler arasında gerçekleşen reaksiyonunun mekanizması kısaca şöyledir:



Folin-Ciocalteu reaktifi heteropolifosfotungstat-molibdat içeren bir oksidasyon belirteçidir. En son oluşan mavi ürün,  $\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}^{7-}$ 'den  $\text{H}_4\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}^{8-}$  kadar olan tungstat serisindeki 1, 2, 4 ve 6 elektronlu reaksiyon ürünleri ile  $\text{H}_2\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}^{6-}$ 'den  $\text{H}_6\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}^{6-}$  kadar olan molibdat serisindeki 2, 4 ve 6 elektronlu reaksiyon ürünleri karışımından oluşur. Bu yöntem daha önceki yıllarda şarap endüstrisinde yaygın kullanılırdı. İlk olarak 1927 yılında keşfedildi ve 1965 yılında Singleton ve Rossi tarafından modifiye edildi. Folin-Ciocalteu yöntemi polimerizasyon derecesinden bağımsız duyarlı ve kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntem *Lamiaceae* familyasında bulunan bitkilerin toplam fenol tayinlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wojdylo ve ark. 2007).

Bitki ekstraktlarında toplam fenol tayini ölçümlerinde Folin-Ciocalteu yöntemi yanında enzimatik yöntemde kullanılabilir (Stevanato ve ark. 2004). Bu yöntemde hidrojen peroksit varlığında horseradish peroksidaz enzimi yükseltgenir. Yükseltgenen bu enzimin fenoller (antioksidanlar) ile reaksiyona girmesi sonucu fenoksil radikalleri oluşur. Bu radikallerin 4-aminoantipirin yapısındaki aromatik amin grubuna saldırması sonucu kuinon-imin renkli ürünü elde edilir (Şekil 2.4.4.1.1).



**Şekil 2.4.4.1.1.** Enzimatik yöntem mekanizması (HRP: Horseradish peroksidaz enzimi)

Genel olarak horseradish peroksidaz enziminin seçiciliği az olmasına rağmen, gerçekte pek çok sayıda fenolik bileşiklerle aromatik donör moleküllerini oluşturmak üzere reaksiyona girmektedir (Adam ve ark. 1999, Veitch ve Smith 2001). Aynı zamanda fenol B halkasını içeren flavonoidler (Chan ve ark. 1999) ve polifenoller (Galati ve ark. 2002) ariloksi radikalleri oluşturmak üzere peroksidaz/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında yükseltgenebilirler. Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin para konumunda hidroksil grupları bulunduğu zaman, 4-aminoantipirin ile reaksiyonun orto konumunda gerçekleştiği belirtilmiştir (Fiamegos ve ark. 2000). Fenolik bileşiklerin oksidasyonu için alternatif yöntem enzim katalizli oksidasyon yöntemidir. Enzimlerin farklı sınıfları bu reaksiyonu katalizler. Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Uluslar Arası Birliği Adlandırma Komitesine göre bu enzimler oksidoreduktaz sınıfının E.C. 1 bölümünü oluşturur. Fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen üç temel enzim sınıfı şunlardır: oksijeni elektron alıcı olarak kullanan oksidoreduktazlar (E.C. 1.10.3), peroksidazlar (E.C. 1.11.1) ve monofenol monooksijenazlar (E.C. 1.14.18.1). E.C. 1.11.1 sınıfını oluşturan peroksidazlar, hidrojen peroksiti fenolik maddeleri yükseltmek için elektron alıcı olarak kullanırlar. Horseradish peroksidaz (E.C. 1.11.1.7), mangan peroksidaz (E.C. 1.11.1.13) ve diarilpropan peroksidaz (E.C. 1.11.1.14) peroksidaz sınıfı enzimlerdir. Bu enzimler hemoproteinlerdir. Fenolik maddelerin oksidasyonu sırasında, hidrojen peroksit peroksidaz enziminin aktif kısmını yükseltger, aktif bölgeye bağlanan fenolik maddenin yükseltgenmesi ile enzim indirgenmiş haline geri döner.

Enzimatik toplam fenol tayini yöntemlerinde kullanılan horseradish peroksidaz enzimi yabanturpu köklerinden (*Amoracia rusticana*) izole edilir. Dört adet disülfür köprüsü içeren tek zincirli polipeptit ve %18 karbonhidrat içeren bir glikoproteindir. Molekül ağırlığı 44000 Da'dır (33890 Da polipeptit zinciri, 9400 Da karbonhidrat zinciri).

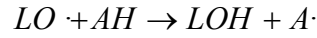
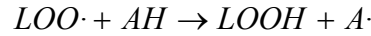
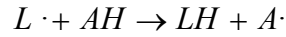
#### **2.4.4.2. Toplam antosiyanin tayini**

Bitkilerde ve gıdalarda toplam antosiyanin tayini pH farkı yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak yapılır (Giusti ve Wrolstad 2001). Uygulanan yöntemde potasyum klorür çözeltisi ve sodyum asetat tamponu kullanılarak antosiyanin

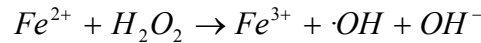
pigmentlerinin pH değeriyle değişen renk ve şiddetlerine göre absorbans değerlerinin değişimi esas alınarak miktar tayini yapılır. Antosiyaninler pH 1,0'de renkli oksonyum ya da flavilyum, pH 4,5'da ise renksiz karbinol yapısında bulunurlar.

#### 2.4.4.3. Antioksidan aktivite tayinleri

Antioksidanlar, yükseltgenen bir substrata (örneğin; lipid, protein, DNA vb.) göre düşük konsantrasyonlarda bulunduğu dahi o substratın oksidasyonunu geçiktirebilen ya da engelleyebilen maddelerdir. Geleneksel olarak antioksidanlar iki sınıfa ayırabiliriz: birincil/zincir kırıcı antioksidanlar ve ikincil/koruyucu antioksidanlar. Zincir kırılma mekanizmasında bir lipid ( $L\cdot$ ) radikaliyle reaksiyon sonucu radikal başlatımı ya da peroksil ( $LOO\cdot$ ) veya alkoksil ( $LO\cdot$ ) radikalleriyle reaksiyon sonucu radikal ilerlemesi basamakları durdurulmuş olur.



Diğer taraftan, ikincil antioksidanlar lipid vb. substratların oksidasyon hızını yavaşlatırlar. Örneğin, metal şelatlayıcılar Fe(II)'yi bağlayarak hidroksil radikalleri oluşturan Fenton tipi reaksiyonları engelleyebilir:

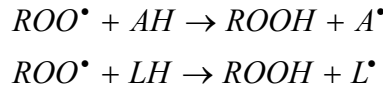


Antioksidanların çok ve çeşitli oluşu, sebze-meyve matrislerinden ayrılmalarını ve bireysel kantitatif tayinlerini güçleştirir. Ayrıca antioksidanların eşgüdüm içinde davranarak birbirlerinin etkisini arttırmaları da söz konusudur. Bu nedenle, toplam antioksidan düzeyini doğrudan bitkisel ekstraktlarda ve biyolojik sıvılarda ölçebilecek güvenilir yöntemlere ihtiyaç vardır. Antioksidan tayinlerinde reaksiyon türüne göre sınıflandırma yapılabilir (Apak ve ark. 2007):



- Elektron transferine dayanan yöntemler
- Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler

Hidrojen atomu transferi esaslı tayinlerin büyük bölümü yarışmalı reaksiyon kinetiğine dayalıdır. Burada antioksidan ve substrat, azo bileşiklerinin ısıl bozunmasından üretilmiş olan peroksil radikalleri ( $ROO^*$ ) için yarışmalar:



Antioksidan ( $AH$ )'ın tüketimi pahasına lipid ( $LH$ ) oksidasyonu engellenir. Diğer taraftan elektron transferi esaslı yöntemler, indirgenildiğinde renk değiştiren yükseltgenlerin indirgenmesi yardımıyla antioksidanların aktivitesini ölçerler. Bu olay bir absorbans artışı veya azalışı şeklinde olabilir. Renk değişiminin derecesi, başlangıç örneğindeki toplam antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir. Gerçekte elektron ve hidrojen atomu transferi esaslı reaksiyonlar birbirleriyle iç içedir ve aralarında aşılmaz sınırlar yoktur.

Elektron transferine dayanan başlıca yöntemler: Folin, ABTS ve DPPH yöntemleridir. Bir örneğin indirgeme kapasitesi onun radikal süpürme yeteneği ile doğrudan ilişkili olmamakla beraber, bu antioksidanlar için çok önemli bir parametredir.

#### 2.4.4.3.1. ABTS yöntemi

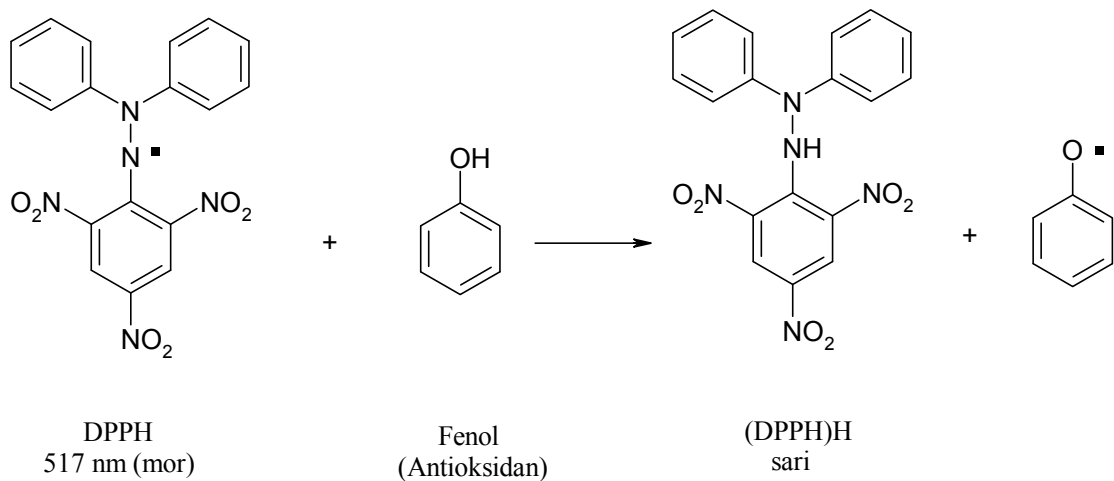
Saf bileşiklerin toplam antioksidan aktivite ölçümleri için kullanılan ABTS [(2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] radikal katyonunun elde edilmesi (Wolfenden ve Willson 1982) spektrofotometrik yöntem temeline dayanır (Rice-Evans ve ark. 1996, Miller ve Rice-Evans 1996). Mavi/yeşil renkte olan  $ABTS^{+}$  radikali, ABTS ve potasyum persülfat arasındaki reaksiyon sonucu oluşur. Bu radikal katyon 645 (Miller ve ark. 1993), 734 (Rice-Evans ve Miller 1994) ve 815 nm'de (Miller ve Rice-Evans 1996) maksimum absorbansa sahiptir. Hazırlanan ABTS radikali üzerine antioksidanların eklenmesiyle antioksidan aktivitenin zamanına ve büyüklüğüne,

antioksidan konsantrasyonuna ve reaksiyon süresine bağlı olarak ABTS katyonunun miktarı azalmaktadır. Reaksiyon sonunda ABTS radikal katyonunun % inhibisyon değeri, standart olarak kullanılan Trolox eşdeğerinde hesaplanan konsantrasyon ve zamanın fonksiyonu olarak tayin edilir.

Antioksidan aktivite çalışmalarında *Lamiaceae* familyasında bulunan bitkilerin doğal antioksidanlar kaynağı olarak potansiyel oluşturduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalarda *Lamiaceae* familyasında bulunan bitkilerin antioksidan aktivite çalışmaları ABTS yöntemiyle başarılı bir şekilde yapılmıştır (Erkan ve ark. 2008, Dastmalchia ve ark. 2008, Yeşil-Çeliksa ve ark. 2007).

#### 2.4.4.3.2. DPPH yöntemi

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali (DPPH) 1958 yılında Blois tarafından bulunan antioksidan aktivite ölçümlerinde yaygın olarak kullanılan kararlı bir radikaldir. Alkol ortamında mor renkte olan bu radikal 517 nm’de maksimum absorbansa sahiptir. DPPH radikali ile antioksidanlar arasındaki etkileşim sonucu radikalın absorbans değeri azalır. Bileşiklerin antioksidan aktivite ölçümleri bu absorbans azalmasına dayanılarak yapılır. DPPH radikali ile antioksidan arasında gerçekleşen reaksiyon (Son ve Lewis 2002) Şekil 2.4.4.3.2.1’de gösterilmiştir.

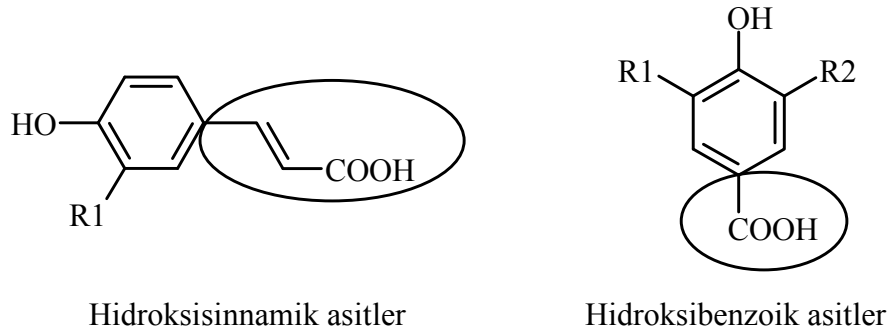


Şekil 2.4.4.3.2.1. Antioksidanların DPPH ile radikal süpürme reaksiyonu

DPPH, organik çözücülerde özellikle etil alkolde çözünebilen bir radikaldır. Bu durum ABTS ile karşılaştırıldığında hidrofilik antioksidanların antioksidan aktivite ölçümlerinde sınırlamalar getirmektedir. Bu radikalde ABTS gibi *Lamiaceae* familyasında bulunan bitkilerin antioksidan aktivite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Wojdylo ve ark. 2007).

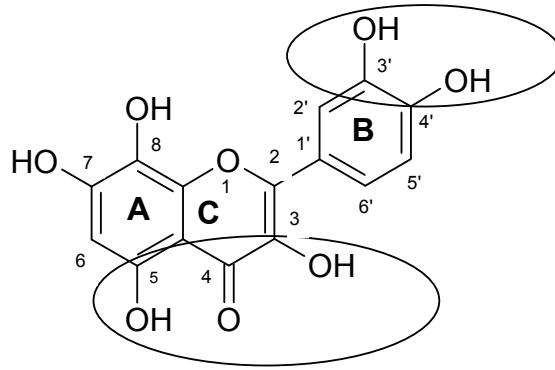
#### 2.4.5. Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliği

Fenolik asitlerin ve flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri aromatik halkaya bağlanan hidroksil grubu sayısına ve hidroksil gruplarının pozisyonuna göre değişiklik göstermektedir (Cuvelier ve ark. 1992). Sınnamik asit türevlerinin antioksidan aktivitelerinin benzoik asit türevlerinden daha fazla olduğu belirtilmiştir ve bu durum sınnamik asitlerin propenoik asit (-CH=CH-COOH) kısmının benzoik asitlerin karboksil gruplarından (-COOH) daha fazla antioksidan etkiye sahip olmasıyla açıklanmıştır (Cuvelier ve ark. 1992). Ayrıca fenolik bileşiklerin *orto* ya da *para* pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının hidrojen atomlarını serbest radikallere daha kolay vermesi (De Heer ve ark. 1999) ve birbirleriyle etkileşimde olmaları antioksidan aktivite üzerinde *meta* pozisyonunda bulunan hidroksil gruplarına göre daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir (Sroka ve Cisowski 2003) (Şekil 2.4.5.1). Yapılan çalışmalarda benzoik ve sınnamik asit türevlerinin, flavonolların ve antosiyanidinlerin aromatik halkaya bağlı hidroksil grubu sayısı arttıkça antioksidan aktivitelerinin arttığını göstermektedir (Fukumoto ve Mazza 2000).



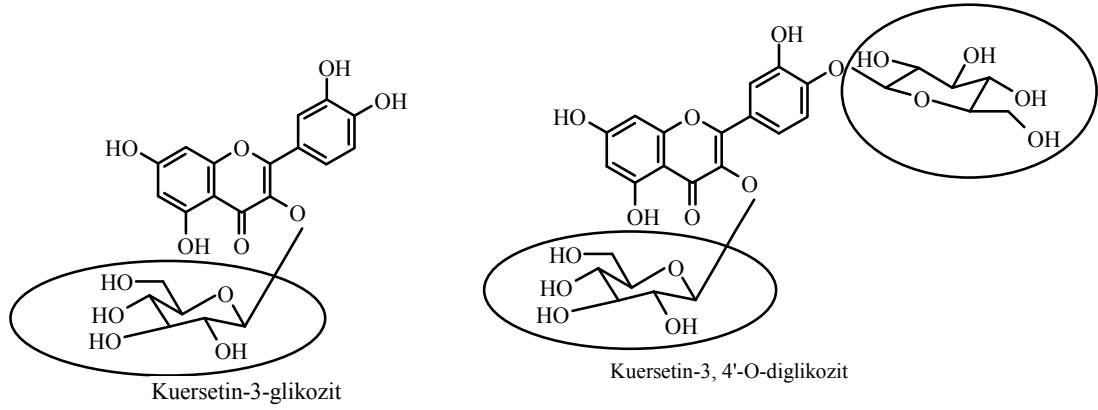
**Şekil 2.4.5.1.** Hidroksisınnamik ve hidroksibenzoik asitlere serbest radikal süpürme özelliği veren yapılar

Flavonoidlere antioksidan aktivite özelliği kazandıran yapılar belli bir sayı, düzen ve fenol halkasında bulunan hidroksil gruplarının yapısal konjugasyonunu içerir (Miller ve ark. 1997). Flavonoidlerin serbest radikal süpürme potansiyelleri karakteristik bazı yapıların bulunması ile tayin edilir. Bu yapılar (1) B halkasında bulunan 3,4-dihidroksil grubu, (2) C halkasında bulunan 3 numaralı karbona bağlı OH grubu ve 4 numaralı karbonla çift bağ yapan oksijen (3) A halkasında bulunan 5 numaralı karbona bağlı OH grubudur (Şekil 2.4.5.2).



**Şekil 2.4.5.2.** Flavonoidlere serbest radikal süpürme aktivitesi özelliği veren karakteristik yapılar

Hidroksil gruplarının düzenlenmesindeki değişiklik ve hidroksil gruplarına glikozit yapılarının bağlanması flavonoidlerin antioksidan aktivitelerini düşürmektedir (Rice-Evans ve ark. 1996). Flavonollarla ilgili yapılan bir çalışmada kuersetinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Ancak, kuersetinin 3-hidroksil grubuna glikozit yapısının bağlanmasıyla oluşan rutin yapısının oldukça düşük aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışma da ise kuersetin, siyanidin, pelargonidin ve peonidinin glikozit yapılarının aglikonlarından daha düşük aktiviteye sahip olduğu ve eklenen ikincil glikozit yapılarının aktiviteyi daha fazla azalttığı bulunmuştur (Şekil 2.4.5.3). Antioksidan etkinin bu azalışı karbohidrat kısmının sebep olduğu sterik etkiyle açıklanmaktadır.



**Şekil 2.4.5.3.** Antioksidan aktiviteyi azaltıcı yönde etki eden glikozit ve diglikozit yapılar

Çözücülerin sahip olduğu özellikler, flavonoidlerin antioksidan aktivitelerini etkilemektedir. Örneğin 2,2-azobis(2-amidinopropan) hidrofilik radikali ile hidrofilik ortamda (su) bulunan naringin, narirutin, naringenin, neoerisitrin gibi flavonoidler antioksidan özelliği gösterirler. Buna karşılık 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) gibi lipofilik radikali ile lipofilik ortamda bulunan bu flavonoidler prooksidant özelliği gösterirler (Finotti ve Di Majo 2003). Polar bir çözücü içinde suyun hidroksil iyonlarından daha kararlı ve asidik iyonlar içeren flavonoidler antioksidan özelliği gösterirler. Polar olmayan çözücülerde ise flavonoidler su ile reaksiyona girmezler ve  $ROO^*$  serbest radikali sadece  $-OH$  ve  $-OCH_3$  grupları reaksiyona girer (Finotti ve Di Majo 2003).

Yapılan bir çalışmada çözücünün polaritesi arttıkça kuersetinin antioksidan aktivitesi azaldığı belirtilmiştir. Bunun sebebi çözücü ile kuersetin arasındaki hidrojen bağının kuersetinin hidrojen verme eğilimine göre değişmesidir (Pinelo ve ark. 2004). Aynı zamanda kuersetinin antioksidan aktivitesi, 37 °C'de etil alkol, metanol veya etil alkol-su çözeltilerinde inkübasyonu süresince değişiklik göstermektedir. Kuersetinin etil alkol ortamında gerçekleştirdiği en yaygın reaksiyon polimerizasyon olmakla birlikte suda en fazla gerçekleştirdiği reaksiyon oksidatif ayrılımdır (Pinelo ve ark. 2004).

Çözelti ortamının pH değeri de antioksidan aktiviteyi etkilemektedir. Çayda bulunan kateşinler için yapılan bir çalışmada B halkasında bulunan orto-trihidroksil gruplarının

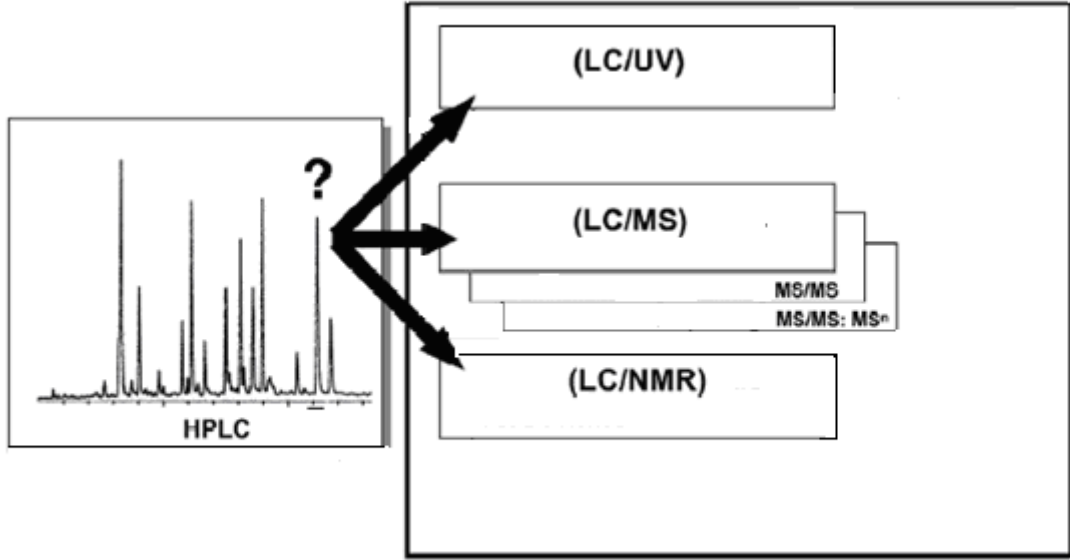
ve flavan-3-ol iskeletinde 3 pozisyonundaki galloil kısmının radikal süpürme aktivitesinden sorumlu olduğu ve çok geniş pH aralığında etkilerinin fazla olduğu tespit edilmiştir (Nanjo ve ark. 1996). Antioksidan olan kafeik, klorojenik ve gallik asitin bazik ortamda kararlı olmadıkları bilinmektedir (Friedman ve Jurgens 2000). Aynı zamanda elma suyuna eklendiğinde klorojenik asit için asidik ortamın daha uygun olduğu bulunmuştur. (-)-Kateşin , (-)-epigalokateşin, ferulik asit, rutin ve trans-sinamik asit pH 3–11 aralığında daha kararlıdır.

## 2.5. İzolasyon

Bir organik molekülün yapı analizi için en kolay yol, hidrojen ve karbon atomları türüne ve sayısına bakmak ve/veya fonksiyonel grupları aramak yerine tüm yapısına birden bakmaktır. Kütle spektrometrisi, günümüzde mevcut spektroskopik yöntemler arasında kimyacıya molekülün tüm yapısı hakkında bilgi veren ve çoğu kez molekül kütlesinin ve molekül formülünün de bulunmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem pahalı oluşu ve özel kullanım tekniği gerektirdiği için kızıl ötesi ve nükleer magnetik rezonans (NMR) spektrometrisinin aksine ancak büyük araştırma grupları tarafından kullanılmaktadır. Bununla beraber; MS ile çok az miktarda (pikogram) madde kullanılarak yapı analizi yapıldığı gibi, GC ve LC tekniklerine bağlanarak da karışımların analizi yapılmaktadır. GC-MS ve LC-MS gibi ikili tekniklerle birlikte LC/UV-DAD, LC/MS, LC/MS/MS ve LC/NMR gibi tekniklerde organik madde yapı tayinlerinde ve izolasyon çalışmalarında kullanılmaktadır.

Biyolojik örneklerden flavonoid ve flavonoid metabolitlerinin izolasyonu, kalitatif ve kantitatif analiz için çok büyük önem taşımaktadır. İzolasyonu gerçekleştirebilmek için, biyolojik matriksin kompleks olmasından dolayı hedef analitlere yapılan interferens etkilerin ortadan kaldırılması, flavonoid ve flavonoid metabolitleri düşük miktarda bulunduğu için duyarlılığın artırılması gereklidir. Flavonoidler, bitki ekstraktlarında genellikle kompleks karışım halinde bulunurlar. Bu karışım flavonoid aglikonlarını ve glikozitlerini içerdiği gibi fenolik asitleri ve tanninleri de içerir. Flavonoidlerin yapıları benzer özellikte olduğu için kromatografik davranışları da benzerlik gösterir. Bununla birlikte bazı flavonoidlerin substitue olmayan hidroksil gruplarından dolayı asidik

özelliik göstermeleri, flavonoidlerin ayrılması ve izolasyonunu zorlaştırır. Bitki ekstraktlarında bulunan flavonoidlerin yapı analizlerinde ve izolasyon çalışmalarında ikili tekniklerin kullanılması gereklidir (Şekil 2.5.1).



Şekil 2.5.1. Flavonoidlerin analizlerinde kullanılan kromatografik teknikler

Yapılan pek çok kantitatif analiz çalışmalarında HPLC-UV/MS tekniğinin kullanıldığını görmekteyiz. HPLC-MS tekniğinin kullanılması, örnekte az miktarda bulunan maddelerin, izomerik ve kromofor grupları dışındaki yapıların kantitatif analizlerinde duyarlılığı ve seçiciliği artırır. Bununla birlikte NMR tekniği de yapı aydınlatılması çalışmalarında oldukça etkili bir tekniktir. Kantitatif analiz çalışmalarında  $^1\text{H}$  NMR tekniğinin sağladığı avantajlar oldukça fazladır. Bu teknik hızlı ve hiçbir örnek hazırlama basamağı gerektirmeyen bir tekniktir. Karmaşık örneklerde az miktarda bulunan ve UV absorpsiyonu olmayan maddelerin analizlerinde NMR tekniğinin kullanılması kantitatif analiz çalışmalarında kolaylık kazandırmaktadır (van Beek ve ark. 1993). Kantitatif analiz ve izolasyon çalışmalarında HPLC-MS ve NMR tekniklerinin birlikte kullanılması, yapılan çalışmalardaki başarıyı, güvenilirliği, seçiciliği ve duyarlılığı arttırmaktadır. Çizelge 2.9.1’de HPLC ve NMR ile yapılan bazı çalışmalar kısaca özetlenmiştir.

**Çizelge 2.5.1.** HPLC ve NMR ile yapılan fenolik madde çalışmaları

<b>Martiks</b>	<b>Fenolik maddeler</b>	<b>Analiz yöntemi</b>	<b>Kaynak</b>
<i>Jamesbrittenia fodina</i> O. M. Hilliard	14 tane fenolik madde	LC–NMR	Cogne ve ark. 2003
<i>Trifolium pratense</i> Linn.	2 tane flavonoid izomerik yapılar	LC–NMR	Seger ve ark. 2005
Willow bitkileri ve 13 tane <i>Epilobium stürleri</i>	Flavanon glikozitleri (kamferol-3- <i>O</i> glikozitler): uersitrin, guajaverin, hiperozit, izokuersitrin, tinirisitrin, izomirisitrin	HPLC–UV HPLC–MS <sup>1</sup> H NMR <sup>13</sup> C NMR	Tarantilis ve ark. 1995
<i>Sorocea bomplmdii</i> yaprakları	kuersetin/kamferol-diglikozitler, kamferol-tri-glikozit	HPLC–NMR	Ogawa ve ark. 1999

Flavonoidler ve fenolik asitlerin biyolojik matrislerden ekstraksiyonu ve izolasyonu çalışmalarında çözücü ekstraksiyonu işleminden sonra katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile örnekteki analitler temizlenebilmektedir (de Rijke ve ark. 2006). Böylece matris etkisi yapan bileşenler ayrıldıktan sonra HPLC ve LC-MS ile kalitatif ve kantitatif analiz daha duyarlı ve seçimli olarak yapılabilir. Bununla birlikte her bir fenolik maddenin ayrı ayrı izole edilmesiyle de örnekler karakterize edilebilmektedir. Fenolik maddelerin yapı tayini öncesi izolasyonu için TLC (Pandey ve ark. 1979) ve preparatif HPLC teknikleri (de Pascual-Teresa ve ark. 1998) kullanılmaktadır. Uygun bir TLC kolonu ve çözücüsü ile izole edilen fenolik maddeler tek tek ayrıldıktan sonra LC-MS ve NMR ile yapıları aydınlatılabilir. TLC ile ayrılan fenolik maddeler doğrudan HPLC veya LC-MS (Onyilagha ve ark. 2003) ile tayin edilebildiği gibi preparatif HPLC sistemi kullanarak da preparatif kolonda izole edilen fenolikler UV dedektörü ile tayin edilebilmektedir (de Pascual-Teresa ve ark. 1998).



## **2.6. Kemometrik Yöntemler**

Kemometri, bilgisayar, istatistik ve matematiksel yöntemlerin kimyasal verilere uygulanmasıdır. Ne var ki, tüm bu yöntemlerin limitleri ve varsayımları tam olarak anlaşılmeden kimyasal problemlerin çözümüne yönelik istatistiksel yöntemlerin kullanılması uygun olmamaktadır. Kimyasal veriler tek değişkenli olabildiği gibi çoğu zaman birçok değişkene de bağlı olabilmektedir. Bu değişkenlerden her birinin analiz başlangıcında eşit öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

Kemometrik yöntemlerin en çok gelişmekte olan uygulama alanlarından birisi de çok değişkenli kalibrasyon yöntemleridir (Brereton 1997). HPLC, GC-MS, UV/VIS, LC-MS vb. cihazlardan elde edilen verilerin çok değişkenli olması nedeniyle yapılacak kalibrasyonunda çok değişkenli olması gerekmektedir. Bu nedenle spektroskopi ve kromatografide karmaşık matrislerin analizi, çok değişkenli veriler kullanılarak kemometrik yöntemlerle yapılmaktadır.

### **2.6.1. Verilerin analize hazırlanması**

Kemometrik analizlerde ham veri büyük öneme sahiptir. Yapılan bir deneysel çalışma sonrasında elde edilen verilerin kemometrik hesaplamalarına geçmeden önce verilerin özellikleri dikkatle incelenmelidir. Elde edilen veriler arasında birbirinden çok farklı değerler bulunuyorsa ya da değerler arası büyük dengesizlik varsa, verilerin benzer birimlere çevrilmesi veya ortalama değer etrafında toplanması gerekebilir. Bunun gibi durumlarda verilere optimize korelasyon düzeltmesi (COW), merkezileştirme, sinyal düzeltme ve normalizasyon gibi verilerin analize hazırlanması işlemleri uygulanır.

#### **2.6.1.1. Optimize korelasyon düzeltmesi**

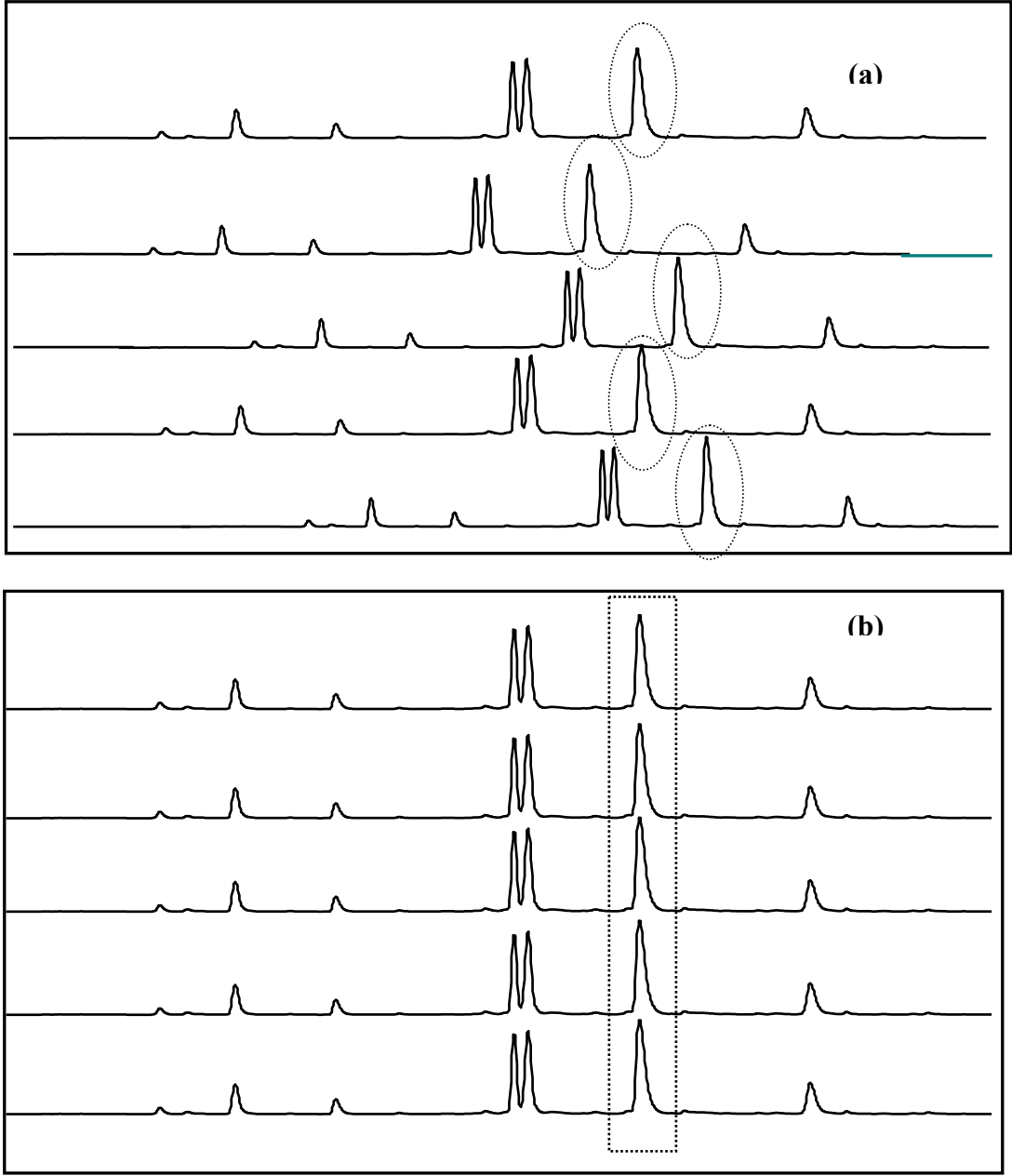
Kromatografik ve spektroskopik verilere uygulanan sinyal düzeltme yöntemleri ikiye ayrılır:

- Dinamik zaman düzeltmesi

- Optimize korelasyon düzeltmesi (COW)

Son yıllarda yapılan çalışmalarda da bu iki yöntemin kullanıldığını görmekteyiz. COW yöntemin ilk defa Nielsen ve ark. (1998) tarafından geliştirilmiştir. COW yönteminde ilk olarak analite ait bütün bilgileri içeren referans (spektrum/kromatogram) vektör seçilir. Daha sonra  $X$  matrisi belli sayıda segmentlere (bölümlere) ayrılır. Segment boyutlarının düzenlemesi (matrisin ayrılacağı grup sayısı) algoritmada yer alan slack parametresi ile belirlenir. Farklı segment boyutları seçilerek örnek ve referans vektörünün korelasyonunun optimum olduğu segment boyutu belirlenebilir. Bu segmentlerde bulunan örnek vektörlerinin başlangıç ve bitiş noktaları sabit kalmak koşuluyla örnek ve referans vektörleri karşılaştırılmaya çalışılır. Böylelikle örnek vektörü ile referans vektörü arasındaki korelasyon optimize edilir. COW yöntemi ile ilgili algoritma bilgileri literatürde ayrıntılı verilmiştir (Tomasi ve ark. 2004, Vial ve ark. 2009).

Eş zamanlı birden fazla örneğin kromatografik analizlerde, elde edilen kromatogramlara ait piklerin alıkonma zamanlarında kaymalar olabilir. COW yöntemi uygun referans kromatogram (alıkonma zamanlarında kayma olmayan, standart kromatogram) seçildikten sonra alıkonma zamanlarındaki bu kaymalar önlenir. Böylelikle örnek kromatogramları referans kromatograma benzetilmiş olur (Şekil 2.6.1.1.1.a,b).



**Şekil 2.6.1.1.1.a)** Alıkonma zamanlarında kayma olan kromatografik pikler, **b)** Optimize korelasyon düzeltmesi yapıldıktan sonra düzelmiş kromatografik pikler

### 2.6.1.2. Merkezileştirme

Kemometrik analizde veri matrisinin  $X$  simgesiyle ifade edildiği ve bu matrisin satırlarının  $i$ , sütunlarının ise  $j$  simgeleriyle gösterilir. Buna göre  $X_{ij}$  şeklindeki bir veri matrisinin merkezileştirme işlemi şu eşitliğe göre yapılmaktadır:

$${}^m\mathbf{X}_{ij} = \mathbf{x}_{ij} - \mathbf{x}_j^{ort} \quad (2.6.1.2.1)$$

Eşitlikte  ${}^m\mathbf{X}_{ij}$  merkezileştirme işlemi yapılmış matrisi ifade etmektedir.  $\mathbf{x}_{ij}$   $i$ 'inci satır  $j$ 'inci sütundaki matris elemanını,  $\mathbf{x}_j^{ort}$  ise her bir kolonun ortalamasını belirtmektedir. Eşitlikten de görülebileceği gibi, matristeki her bir kolonun ortalamasının kolon elemanlarından çıkarılmasıyla matris verisinin merkezileştirme işlemi yapılmış olmaktadır. Böylece matristeki her bir değer ortalama çevresinde toplanmış olur.

### 2.6.1.3. Sinyal düzeltme

Sinyal düzeltme teknikleri, aletten gelen gürültü sinyallerini ortadan kaldırmak için spektroskopik ve kromatografik verilere uygulanır. Böylece örneğe ait düzleştirilmiş gerçek spektrum veya kromatogram elde edilir. Bu çalışmada kromatografik verilerden gürültü sinyallerinin elimine edilmesi için Whittaker sinyal düzeltme tekniği kullanılmıştır (Eilers 2003).

### 2.6.1.4. Normalizasyon

Normalizasyon işlemi verilerin sabit bir değere getirilmesi işlemidir. Matris üzerinde normalizasyon işlemi yapılırken önce sütun elemanlarının kareleri toplanır ve karekökü alınır. Sonra her bir sütun elemanı bu değere bölünür. Bu işlem her bir sütun için ayrı ayrı hesaplandıktan sonra normalizasyon işlemi tamamlanmış olur. Eşitlikte  ${}^N\mathbf{X}_{ij}$  simgesi normalize edilmiş matrisi ifade etmektedir.

$${}^N\mathbf{X}_{ij} = \frac{\mathbf{x}_{ij}}{\sqrt{\sum_{j=1}^I \mathbf{x}_j^2}} \quad (2.6.1.4.1)$$

## 2.6.2. Çok değişkenli kalibrasyon teknikleri

Temel bileşen regresyon analizi (PCR), kısmı en küçük kareler regresyonu (PLS), ortagonal sinyal düzeltmesi (OSC) gibi çok değişkenli kemometrik yöntemler kullanılarak spektrum ve kromatogramdan analitik bilgi elde edilebilmektedir. Böylelikle pek çok sinyalin aynı anda kullanımı sağlanmaktadır. Ayrıca bu teknikler örnek hazırlama işlemi gerektirmeden karmaşık matrisler için doğru ve kesin analitik sonuç elde edilmesini sağlarlar.

### 2.6.2.1. Temel bileşen regresyon analizi

Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleriyle karışım içindeki her bir bileşenin miktarı tayin edilebilmektedir. Ancak bazı sınırlamaları dikkate almak gerekir. PCR ile kantitatif tayin yaparken değişken sayısının az olmasına ve her bir değişken arasında lineer ilişkinin olmamasına dikkat edilmelidir. Bunların yapılabilmesi için öncelikle temel bileşen analizi yapılarak değişken sayısı istenen boyuta indirgenir. Daha sonra skor ve loadinglerin hesaplanması ile değişkenler arası lineer ilişki kaldırılmış olur. Kalibrasyon için temel bileşen analizinden hesaplanmış olan skor değerleri ( $T$  değişkenleri) kullanılır.  $T$  değerleri kullanılarak regresyon katsayısı aşığıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\mathbf{b} = (\mathbf{T}' \mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}' \mathbf{y} \quad (2.6.2.1.1)$$

Buradaki  $T$  değişkenleri ortagonaldir ve formüldeki  $T' \times T$  matrisinin inversi alınabilir. Temel bileşen regresyonunda görüldüğü gibi temel bileşenler kalibrasyon modelini oluşturmak için kullanılır. Korelasyon katsayısı  $\mathbf{b}$ , tahmini konsantrasyon  $\hat{y}$  değerlerini hesaplamak için kullanılır. Bu şekilde karışım içindeki her bir maddenin konsantrasyonları hesaplanmış olur.

$$\hat{y} = \mathbf{T} \mathbf{b} \quad (2.6.2.1.2)$$

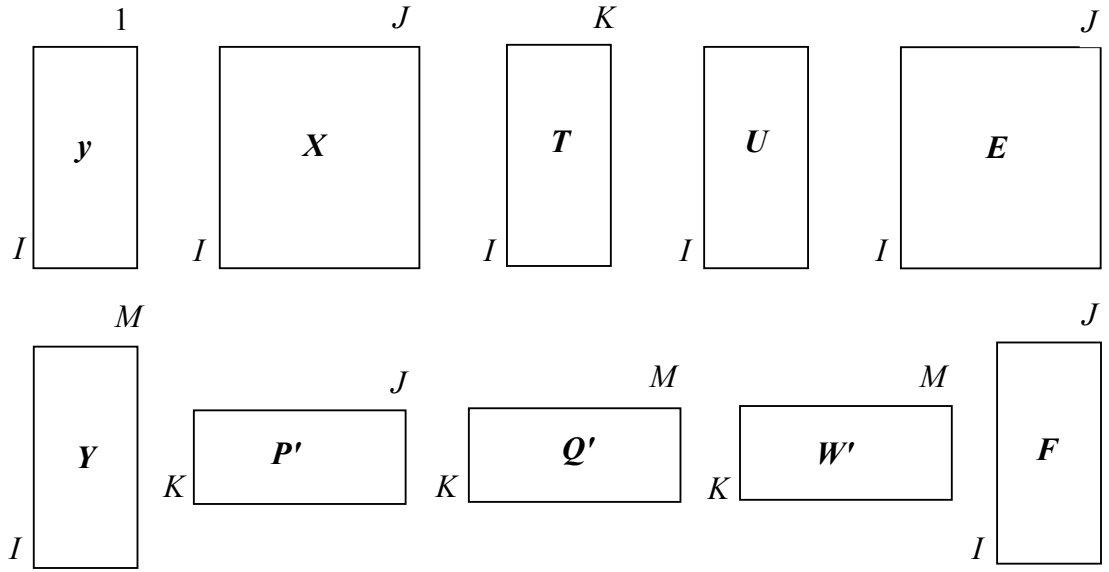
### 2.6.2.2. Kısmi en küçük kareler regresyon analizi

Kısmi en küçük kareler regresyonu, kemometrik çalışmalarda en fazla kullanılan çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerinden birisidir. PLS kalibrasyonu iki şekilde yapılabilmektedir. Bunlar PLS1 ve PLS2 olarak adlandırılmaktadır. PLS1 yönteminde karışım içindeki bileşenler tek tek incelenirken PLS2’de bileşenlerin hepsi aynı anda incelenmektedir. Bileşenlerin birbiri ile örtüşme miktarına bağlı olarak PLS yöntemi seçilmelidir. Örtüşmenin fazla olduğu durumlarda PLS2 daha iyi sonuç vermektedir.

Kısmi en küçük kareler regresyonu ilk defa ekonometri alanında H.Wold tarafından 1960’lı yıllarda geliştirilmiştir (Demir 1997). Bu yöntem birçok bilim dalında geniş uygulama alanları bulmuştur. 1980’li yıllarda Kowalski tarafından kimyasal verilerin analizinde kullanılmıştır (Kowalski ve ark. 1982). Kemometri alanında yapılan çalışmalar PLS kalibrasyon yönteminin diğerlerine göre kantitatif olarak daha doğru tahmini sonuçlar verdiği görülmüştür. PLS kalibrasyon yönteminde değişken sayısı azaltılır ve değişkenler arası lineer ilişki ortadan kaldırılır. PLS uygulanırken skor ve loading değerleri aşağıdaki formüllere göre hesaplanır. Kısmi en küçük kareler regresyonu eş zamanlı bütün veri bloklarına uygulanır.  $X$  matrisi ve  $y$  vektörü şu şekilde ayrılır.

$$X = TP' + E \quad \text{ve} \quad y = Uq' + F \quad (2.6.2.2.1)$$

$T$  ve  $U$ ,  $X$  matrisinin değişkenleri,  $y$  bir bileşenin konsantrasyonu,  $P$  ve  $q$  ise loading,  $E$  ve  $F$  ise hata değerleridir.  $U$  ve  $q$  boyutları sırasıyla  $I \times N$  ve  $1 \times N$  şeklindedir. Şematik olarak boyutlar Şekil 2.6.2.2.1.’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.6.2.2.1.** Kısmi en küçük kareler regresyon matrislerinin grafiksel gösterimi

PLS kalibrasyonu için farklı algoritmalar kullanılır. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanı NIPALS algoritmasıdır. Bu algoritma karışım içindeki her bir bileşenin kantitatif tayini için veri matrisindeki değişkenlere ardışık olarak uygulanır ve her bir bileşenin konsantrasyonu ayrı ayrı hesaplanır. Ayrıntılı PLS algoritması literatürde bulunabilir (Demir 1997).

### 2.6.2.3. Ortogonal sinyal düzeltmesi

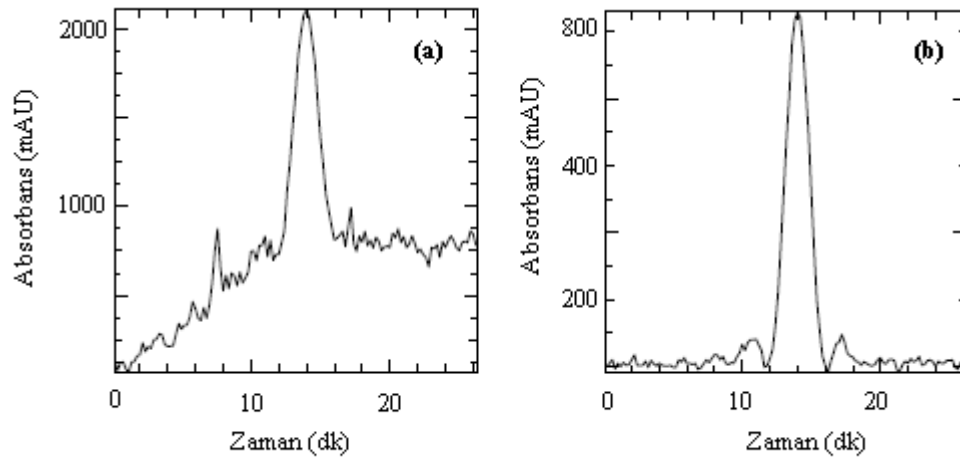
Ortogonal sinyal düzeltmesi (OSC) yöntemi ilk defa Wold ve ark. (1998) tarafından geliştirilmiştir. OSC yöntemi, veri matrisine göre ilgisiz ve ortogonal olan yanıt matrisi üzerinden sistematik varyansın kaldırılması için uygulanır. Sistematik varyansın kaldırılması ile matriste bulunan analite ait önemli bilgilerin korunması sağlanır. Son yıllarda sinyal üzerinden ortogonal bileşenlerin kaldırılmasıyla model karmaşıklığının azaltılması için farklı gruplar tarafından farklı OSC algoritmaları geliştirilmiştir. Örtüşen piklerin bulunduğu spektroskopik ve kromatografik analizlerde çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada özellikle PLS ile eşzamanlı tayin yöntemlerinde OSC kullanımı artmıştır. OSC yönteminde ilk olarak gürültünün  $X$  matrisi üzerindeki etkisi göz önüne alınır. OSC,  $X$  matrisi üzerinden gürültü etkisinin kaldırılmasını sağladığı için ön işlem basamağı

sayılabilir (Şekil 2.6.2.3.1.a,b). Böylelikle OSC-PLS yönteminde gürültünün etkisi ortadan kaldırıldıktan sonra PLS ile eş zamanlı tayinler gerçekleştirilir.  $y$  den bağımsız  $X$  matrisinden bileşenlerin ayrılarak cevap oluşturulması temeline dayanır.  $X$  ve  $y$  arasındaki birlikte değişim OSC tarafından minimize edilir. Analit sinyaline dıştan gelen önemli etkileri uzaklaştırır.

$$X = X_o + X_{OSCPLS} + E \quad (2.6.2.3.1)$$

$$X_{OSCPLS} = X - T_o P_o \quad (2.6.2.3.2)$$

$X$ , veri matrisini,  $T_o$  skor matrisini,  $P_o$  loading matrisini ifade eder. Birden fazla OSC bileşeni belirlenir ve bu bileşenler  $X$  matrisinden ayrılırlar. OSC bileşenleri, standart PLS bileşenlerine benzerler. Elde edilen  $X_{OSCPLS}$  matrisi çok değişkenli kalibrasyon yönteminde kullanılır (Lorber 1986, Bertran ve ark.2001).



**Şekil 2.6.2.3.1. a)** Gürültü şiddeti yüksek olan pik, **b)** OSC ile gürültü etkisi ortadan kaldırılmış pik



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan aletler

###### 3.1.1.1. Mor ötesi-görünür bölge (UV/VIS) spektrofotometresi

Çalışmada Varian marka Cary-50 Conc model UV/VIS spektrofotometre kullanılmıştır. Ölçümler 1 cm kuvarz hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasındaki çalışma şartları Çizelge 3.1.1.1.1.'de verilmektedir.

**Çizelge 3.1.1.1.1.** Varian marka Cary-50 Conc cihazının çalışma şartları

Ölçüm Birimi	Absorbans	
Ölçüm Aralığı	Alt değer:0,0	Üst Değer: 3,0
Dalgaboyu Aralığı (nm)	200-800	
Tarama Hızı	0,5 nm aralıklı	
Örnekleme Aralığı	Otomatik	

###### 3.1.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)

*Prunella* L. türlerinde bulunan fenolik bileşikler HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile analizinde, Agilent 1200 HPLC system (Waldbronn, Almanya) model kullanılmıştır.

###### 3.1.1.3. Sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS)

Çalışmada Agilent marka 1100 LC-MSD Trap SL model sıvı kromatografi-kütle spektrometri cihazı kullanılmıştır.

###### 3.1.1.4. pH metre

Çalışmada HANNA model HI 221 model pH metre kullanılmıştır.

### **3.1.1.5. Analitik terazi**

Deneysel çalışmalar sırasında çözelti hazırlama işlemleri için Radwag AS 220/C/2 marka analitik terazi kullanılmıştır.

### **3.1.1.6. Saf su cihazı**

Analizler sırasında kullanılan su, ELGA marka Purelab Option DV 25 model saf su cihazından (su saflığı 18,2 M $\Omega$ ×cm) sağlanmıştır.

### **3.1.1.7. Döner buharlaştırıcı**

Deneysel çalışma sırasında zenginleştirme işlemleri için Bibby RE 301×RE 300 marka cihaz RE 100 EA adaptörü ile kullanılmıştır.

### **3.1.1.8. Çoklu manyetik karıştırıcı**

Deneysel çalışma sırasında örneklerin ekstrakte edilebilmesi için Daihan marka MS-MP8 model çoklu manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

### **3.1.1.9. Etüv**

Deneysel çalışmalar sırasında kurutma işlemleri için VWR marka DL-53 model etüv kullanılmıştır.

### **3.1.1.10. Peristaltik pompa**

Deneysel çalışmalar sırasında Watson-Marlow marka 323S model peristaltik pompa kullanılmıştır.

### **3.1.1.11. Ultrasonik banyo**

Deneysel çalışmalar sırasında çözeltilerin hazırlanması için UTB marka ultrasonik banyo kullanılmıştır.

### **3.1.2. Çalışmada kullanılan bitki türleri**

Bu çalışmada ülkemizde yayılış gösteren *Prunella L.* cinsinin; *Prunella vulgaris L.*, *Prunella laciniata (L.) L.*, *Prunella orientalis Bornm.* ve *Prunella grandiflora L.* olmak üzere 4 türü analiz edilmiştir.

### **3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler**

#### **3.1.3.1. Kimyasallar**

##### **3.1.3.1.1. Analitik safliktaki kimyasallar**

- Merck, 1.06007.2500, Metanol
- Merck, 1.01988.2500, Butanol
- Merck, 1.11727.2500, Etil alkol
- Merck, 1.00030.2500, Asetonitril
- Merck, 1.04391.2500, Hekzan
- Merck, 1.00264.1000, Formik asit
- Merck, 1.06393.1000, Sodyum karbonat
- Merck, 1.06469.1000, Sodyum hidroksit
- Merck, 1.02791.1000, Bakır sülfat
- Merck, 1.08087.1000, Sodyum potasyum tartarat
- Merck, 1.04936.1000, Potasyum klorür
- Merck, 1.06268.1000, Sodyum asetat
- Merck, 8.18401.0500, Potasyum persülfat
- Merck, 1.07293.0100, 4-aminoantipirin
- Merck, 1.07298.1000, Hidrojen peroksit
- Merck, 1.04873.1000, Potasyum dihidrojen fosfat

- Merck, 1.05101.1000, Dipotasyum hidrojen fosfat
- Merck, 1.00314.2500, Derişik hidroklorik asit, %37, d=1,19 g/mL, M=36,46 g/mol
- Merck, 1831, L-Askorbik asit

### **3.1.3.1.2. Diğer kimyasallar**

- Sigma–Aldrich, 536954, Rosmarinik asit
- Sigma, R5143, Rutin hidrat
- Sigma, C3878, Klorojenik asit
- Merck, 822029, Kafeik asit
- Merck, 822070, Ferulik asit
- Merck, 841533, Protokatekuik asit
- Sigma, P8250, EC 1.11.1.7 type II (50 KU/mg of solid), HRP: Horseradish peroksidaz
- Sigma–Aldrich, G7384, Gallik asit
- Sigma–Aldrich, 337951, Kuersetin hidrat
- Sigma–Aldrich, K0133, Kamferol
- Sigma–Aldrich, F9252, Folin-Ciocalteu fenol reaktifi
- Sigma-Aldrich, A1888, ABTS (2,2-azino-di-(3-etilbenzotialozin-sülfonik asit)
- Sigma–Aldrich, D9132, DPPH (1,1-difenill-2-pikrilhidrazil radikali)
- Sigma, LH20100, Sephadex LH-20
- Acros, 21894, Troloks [(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid]

### **3.1.3.1.3. Sarf malzemeler**

- 10-100 µl aralıklı mikropipet (Eppendorf)
- 100-1000 µl aralıklı mikropipet (Eppendorf)
- 500-5000 µl aralıklı mikropipet (Eppendorf)
- Supelco hidrofilik 0,45 µm'lik PVDF enjektör tipi filtre kartuş

### 3.1.3.2. Çözeltiler

#### 3.1.3.2.1. Asidik hidroliz ekstraksiyonunda kullanılan çözeltiler

Çalışmada bitki örneklerinin asidik hidrolizi için derişik hidroklorik asitten (%37,  $d=1,19$  g/mL,  $M=36,46$  g/mol) 50 mL alınarak saf su ile 100 mL seyretilmiş ve konsantrasyonu 6 mol/L olan çözelti hazırlanmıştır.

#### 3.1.3.2.2. Toplam fenol, toplam antioksidan aktivite ve toplam antosiyanin tayinlerinde kullanılan çözeltiler

- 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi: 0,4000 g NaOH suda çözülerek hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- %2 sodyum karbonat çözeltisi: 2,0000 g  $Na_2CO_3$  suda çözülerek hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- %0,5 bakır sülfat ve %1 sodyum potasyum tartarat çözeltisi: 0,5000 g  $CuSO_4$  ve 1,0000 g sodyum  $NaKC_4H_4O_6$  suda çözülerek hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 0,025 M pH 1,0 potasyum klorür çözeltisi: 0,1900 g KCl suda çözülerek hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmış, derişik HCl ile pH 1,0'e ayarlanmıştır.
- 0,4 M pH 4,5 sodyum asetat tampon çözeltisi: 5,4400 g  $CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$  suda çözülerek hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmış, derişik  $CH_3COOH$  ile pH 4,5'a ayarlanmıştır.
- 1 mM DPPH çözeltisi: 0,0394 g DPPH metanolde çözülerek hacmi metanol ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 7 mM ABTS çözeltisi: 0,1920 g ABTS tartılıp saf suda çözülmüş, 0,0331 g  $K_2S_2O_8$  ilave edilerek karıştırılmış ve sonra hacmi saf su ile balon jodede 50 mL'ye tamamlanmış, karanlıkta 12-16 saat bekletilmiştir.
- pH 8 tamponu: 94 mL 1 M  $K_2HPO_4$  (57,0575 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O/250$  mL) ve 6 mL 1M  $KH_2PO_4$  (34,0225 g  $KH_2PO_4/100$  mL) çözeltisi karışımları alınmış ve hacmi 1000 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

- pH 5 tamponu: 2,86 mL derişik CH<sub>3</sub>COOH çözeltilisinden alınmiş saf su ile balon jodede 50 mL'ye tamamlanmıştır. 3,69 mL 1 M CH<sub>3</sub>COOH ve 0,864 g NaCH<sub>3</sub>COO.3H<sub>2</sub>O suda çözümlenerek hacmi saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 4-aminoantipirin: 9 mM 100 mL çözeltilisi için 0,1829 g tartılmış, pH 8 tamponunda çözülmüş, hacmi tampon ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır. 0,45 mM ve diğer 4-aminoantipirin çözeltileri bu stok çözeltiliden seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltilisi: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltilisinden (%35, d=1,13 g/mL, M=34,01 g/mol) 129 µl alınmış hacmi balon jodede 250 mL'ye tamamlanmıştır. Diğer çözeltiler bu stok çözeltiliden seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 2,5 µM enzim çözeltilisi: 0,011 g enzim tartılmış pH 8 tamponunda çözülmüş ve hacmi tampon ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### 3.1.3.2.3. Standart fenolik maddeler ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD) cihazı için standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. 100 mg/L stok çözeltili kullanılarak kuersetin, rutin, rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit ve protokatekuik asit standart fenolik bileşikler için 1, 2, 4, 8,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 mg/L standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltiler, metanolde çözümlenerek hazırlanmıştır. Ekstraksiyon yönteminin geri kazanım değerinin ve uygulanan analitik yöntem validasyonunun hesaplanabilmesi için 100 mg/L çözeltili kullanılmıştır.. Bu çözeltiliden % geri kazanım değerinin hesaplanmasında içerisinde 10 mg/L standart madde içeren ekstraktlar kullanılmıştır. Bu ekstraktlar, *Prunella vulgaris* L. türünün metanol ve metanol-asit ekstraktlarıdır. Uygulanan analitik yöntem validasyonunda kullanılan çözeltiler stok çözeltili kullanılarak hazırlanan her bir standart fenolik bileşik için 1 mg/L derişimine sahip çözeltilerdir.

## 3.2. Yöntem

Bu çalışmada yöntemler beş ana başlıkta toplanabilir. Bunlar;

- Örnek hazırlama işlemleri,
- Spektroskopik yöntemler,
- Kromatografik yöntemler,
- Kemometrik yöntemler,
- İzolasyon çalışmalarıdır.

### 3.2.1. Örnek hazırlama işlemleri

#### 3.2.1.1. Bitki türlerinin toplanması ve analize hazırlanması

*Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella vulgaris* L., *Prunella orientalis* Bornm, *Prunella grandiflora* L. türleri Bursa, Balıkesir ve Antalya illerinden toplanmıştır. Toplanan *Prunella* L. türleri açık havada kurutulup poşetlendikten sonra buzdolabında 4°C’de bekletilmiştir.

Toplanan türlerin lokaliteleri şöyledir:

#### ***Prunella vulgaris* L.**

B2 Bursa: Bursa-Keles, 41 km, 40° 01’ 16’’ N – 29° 07’ 15’’ E, 774 m, 01.05.2008, A. Tosunoğlu & H. Malyer.

#### ***Prunella laciniata* L.**

B2 Bursa: Çalı – İnegazi köyü, İnegazi kavşağına 200 m, 40° 08’ 03’’ K – 28° 52’ 53’’ D, 463 m, 13.05.2009, A. Tosunoğlu & H. Malyer.

#### ***Prunella orientalis* Bornm.**

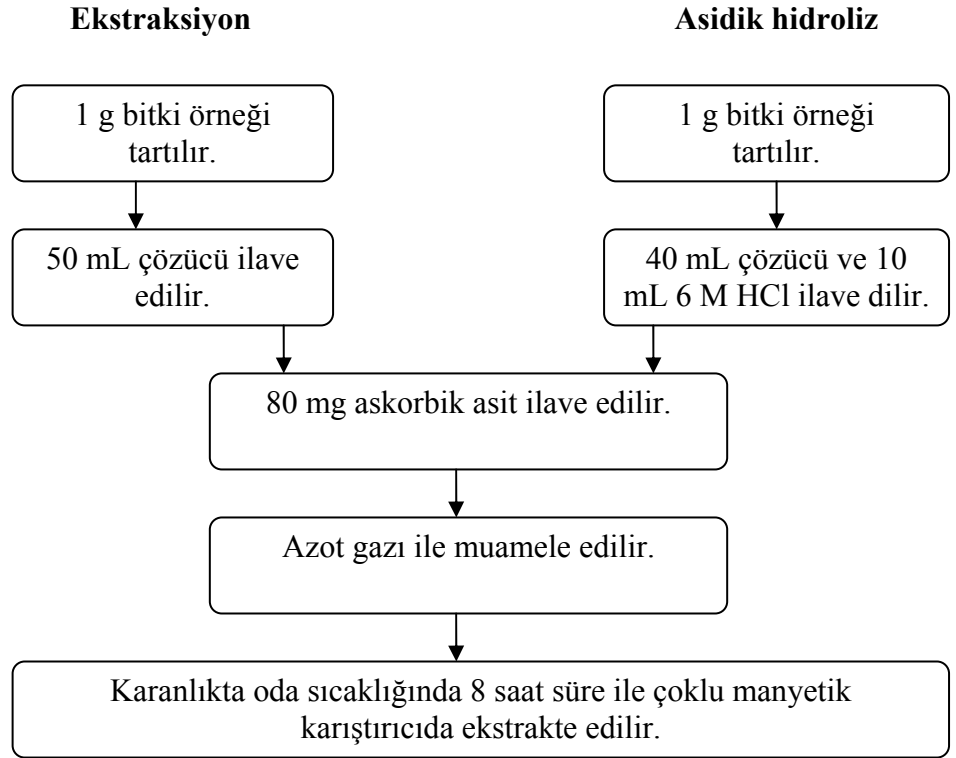
C3 Antalya: Kemer, Kesmeboğazı – Ovacık, Ovacık köyü girişi, meşe dipleri-dere yatağı, 36° 39’ 01’’ K – 30° 25’ 59’’ D, 1116 m, 09.06.2009, A. Tosunoğlu & H. Malyer.

#### ***Prunella grandiflora* (L.) Scholler**

B1 Balıkesir: Edremit, Kazdağı (İda), Kartalçimeni-Karataş tepesi arası, c.1700 m, 24.07.2006, T. Dirmenci (3337) & F.Satıl (E). Edremit, Kazdağı, Kartalçimeni tepesinin kuzey batısı, 1750 m, 28.07.2007, T. Dirmenci (3473) & E. Akçiçek (K).

### 3.2.1.2. Ekstraksiyon çalışmaları

*Prunella* L. türleri, yayılışı saptanan bölgelerden toplandıktan sonra örnekler homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örneklerden belirli miktarlarda tartılarak çözücü ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bitki türlerinin örnek hazırlama işlemleri iki farklı şekilde yapılmıştır:



### 3.2.2. Spektroskopik yöntemler

#### 3.2.2.1. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenol tayini

Ekstraksiyon çalışmalarından elde edilen ekstraktlar için toplam fenol tayinleri çalışmalarında standart madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği için hazırlanan standart gallik asit çözeltilerinden yararlanılmıştır. 0,1 M NaOH içinde %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> olacak şekilde Lowry A çözeltisi ve %1'lik NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> içinde %0,5 CuSO<sub>4</sub> olacak şekilde Lowry B çözeltisi hazırlanmıştır. Lowry A ve Lowry B 50:1 (h/h)



oranında karıştırılarak Lowry C çözeltilisi hazırlanmıştır. Analiz tüplerine 2,5 mL Lowry C çözeltilisi, 0,25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi, x mL örnek/standart ve y mL (2-x) su eklenmiştir. Her bir standardın 750 nm dalga boyunda absorbansları okunarak gallik asit konsantrasyonuna göre (mg/L) grafiğe geçirilmiştir. Ekstraktlar için toplam fenol miktarları hesaplanan kalibrasyon denklemi kullanılarak “mg gallik asit/g örnek” şeklinde hesaplanmıştır. Toplam fenol ölçümlerinde butanol, butanol-asit, hekzan ve hekzan-asit ekstraktları döner buharlaştırıcı uçurulduktan sonra metanolde çözülmüştür.

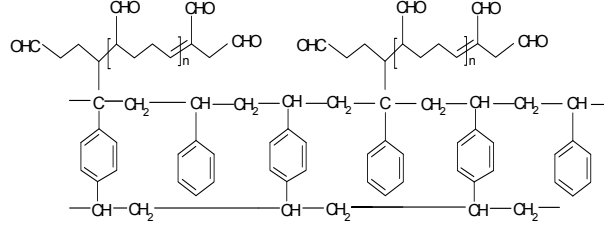
### **3.2.2.2. Serbest enzim yöntemi ile toplam fenol tayini**

Serbest enzim yöntemi ile toplam fenol tayini yöntemi için 0,1 mL bitki ekstraktı üzerine sırasıyla; 2 mL 9 mM 4-aminoantipirin (pH 8 tamponunda hazırlanmış), 1 mL 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 0,9 mL 2,5 µM horseradish peroksidaz enzimi (E.C.1.111.7, 50 kU) eklenmiştir. 1 dk bekletildikten sonra oluşan renkli ürünün 510 nm’de absorbansı UV/VIS spektrofotometresinde ölçülmüştür. Her bir standardın 510 nm dalga boyunda absorbansları okunarak gallik asit konsantrasyonuna göre (mg/L) grafiğe geçirilmiştir. UV/VIS ölçümleri sonucunda her bir örneğin serbest enzim yöntemine göre toplam fenol miktarı, standart madde olarak gallik asit için çizilen kalibrasyon grafiğine göre “mg gallik asit/g örnek” şeklinde hesaplanmıştır.

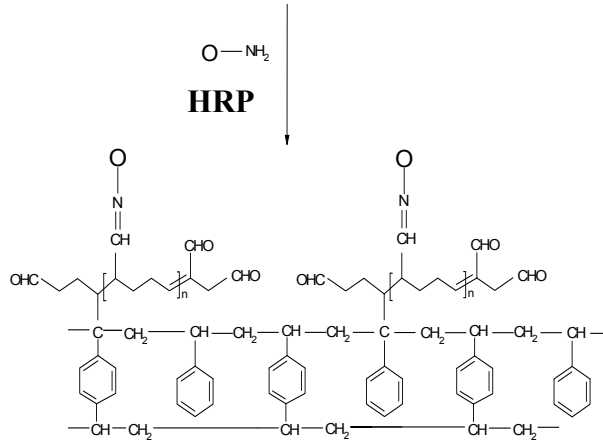
### **3.2.2.3. Enzim immobilizasyonu**

Enzim immobilizasyonu ile toplam fenol tayini yapmak için ilk olarak kullanılacak enzimin polimer üzerinde immobilize edilmesi gerekir. Bu çalışmada kullanılacak olan polimer daha önceden poliglutaraldehit ile aktive edilmiş olan poli(stirendivinilbenzen) polimerdir (Aybastır ve Demir 2010). Poli(stirendivinilbenzen) hidrofobik ve mikroporoz özellikli bir polimerdir. Kullanılan polimerin tanecik büyüklüğü 0,6-1,4 mm aralığındadır. Immobilizasyon için 120 mg poli(stirendivinilbenzen) poliglutaraldehit (STR-DVB-PGA) hacmi 3 mL (6×1 cm) olan polietilen bir kolon içine yerleştirilmiştir. 100 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH 8) hazırlanmış 21 mg horseradishperoksidaz (HRP) enzimi peristaltik pompa yardımıyla 2,5 mL/dk akış hızıyla 26 saat süreyle polietilen kolondan geçirilmiştir. Polimere tutunmayan enzimi

uzaklaştırmak için polimer 0,1 M pH 8 fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Bu işlemle enzim kovalent olarak polimer destek maddesine tutturulmuştur.



Stiren-divinilbenzen-poligluteraldehit (STY-DVB-PGA) polimeri



STY-DVB-PGA polimerine immobilize olmuş HRP

### Şekil 3.2.2.3.1. İmmobilize olmuş HRP

#### 3.2.2.4. İmmobilize HRP yöntemi ile toplam fenol tayini

0,1 M fosfat tamponunda (pH 8) hazırlanmış 0,45 mM 4-aminoantipirin içeren taşıyıcı çözelti 2,5 mL/dk hızla kolondan geçirilirken, 0,1 mL bitki ekstraktı ve 1 mL 2,97 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözelti karışımı kolona verilmiştir. Kolondan geçirilirken oluşan enzimatik reaksiyon sonrası elde edilen kuinon-imin renkli ürününün 510 nm’de absorbansı UV/VIS spektrofotometresinde ölçülmüştür. Her bir standardın 510 nm dalga boyunda absorbansları okunarak gallik asit konsantrasyonuna göre (mg/L) grafiğe geçirilmiştir. UV/VIS ölçümleri sonucunda her bir örneğin immobilize enzim yöntemine göre toplam fenol miktarı, standart madde olarak gallik asit için çizilen kalibrasyon grafiğine göre “mg gallik asit/g örnek” şeklinde hesaplanmıştır

### 3.2.2.5. Bradford yöntemi

İmmobilizasyon işlemi ile HRP enziminin polimer destek maddesi üzerinde tutunan miktarı, immobilizasyon öncesi ve immobilizasyon sonrası çözeltide kalan enzim miktarı farkına göre hesaplanmıştır. Çözeltide bulunan enzim miktarı, Bradford protein analiz yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford 1976). Bu yöntemin temeli coomassie brilliant blue G250 (CBB) boyasının protein molekülü ile kompleks oluşturmaya dayanmaktadır. Ortamdaki protein miktarı arttıkça oluşan renk açık maviden koyu maviye kaymaktadır. Analiz için kullanılan stok boya çözeltisi 100 mg CBB 50 mL metanol içerisinde çözülerek, üzerine 100 mL %85 fosforik asit ( $H_3PO_4$ ) eklenmiş ve saf su ile 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Bu çözelti siyah bant süzgeç kâğıdından süzülerek koyu renkli şişede 4 °C'de saklanmıştır. Analiz için kullanılan çözelti 1 hacim stok boya çözeltisi 9 hacim saf su ilave edilerek hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği çizmek amacıyla standart protein olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. pH 8,0 fosfat tamponunda 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mg/L derişime sahip BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki BSA standart protein çözeltilerinden deney tüplerine x mL alınmış üzerlerine; 0,25 mL Bradford boya çözeltisi ve (2,75-x) mL su eklenerek çalkalanmış ve 5 dk beklendikten sonra 595 nm dalga boyunda UV/VIS spektrofotometresinde absorbansları okunmuştur. Her bir standardın 595 nm dalga boyunda absorbansları okunarak protein konsantrasyonuna (mg/L) karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir.

### 3.2.2.6. HRP aktivite tayini

Enzimatik aktivite ölçümü yükseltgen substrat  $H_2O_2$  ve indirgen substrat ABTS varlığında yapılır (Melgajero ve ark. 2004). Buna göre pH 5 asetat tamponu ortamında, 3 mL 1 mM ABTS ve 1 mM  $H_2O_2$  karışımı enzim immobilize edilmiş kolondan 1 dk süreyle geçirilmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan ürünün 414 nm'de ( $\epsilon_{414nm}=31,1$  mM/cm) absorbansı UV/VIS spektrofotometresinde ölçülmüştür. Bir unit (U) enzim aktivitesi 1 dk içinde 1  $\mu$ mol ürün oluşturan enzim miktarını ifade etmektedir. Aktivite ölçümlerine göre HRP aktivitesi 1 g destek maddesi başına düşen unit miktarı olarak hesaplanır (U/g).

### 3.2.2.7. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enziminin ve serbest HRP enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesi

Serbest HRP enzimi için 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6; 2,0 mM konsantrasyonlarda ABTS çözeltisi kullanılarak Bölüm 3.2.2.6'da belirtildiği gibi aktivite tayini yapılmıştır. Bunun için 120 mg enzim içeren 20 mL enzim çözeltisi (pH 5 asetat tamponunda), 12 mM ABTS çözeltisi (pH 5 asetat tamponunda) ve 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden x mL 6 mM ABTS, 0,5-x mL saf su, 0,5 mL 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 mL enzim çözeltisi karıştırılarak 1 dk sonunda 414 nm'de ( $\epsilon_{414nm}=31,1$  mM/cm) absorbansı UV/VIS spektrofotometresinde ölçülmüştür. STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enzimi için 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6 ve 2,0 mM konsantrasyonlarda ABTS çözeltisi kullanılarak Bölüm 3.2.2.6'da belirtildiği gibi aktivite tayini yapılmıştır. Bunun için 12 mM ABTS çözeltisi (pH 5 asetat tamponunda) ve 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden x mL 6 mM ABTS, 2,5-x mL pH 5 asetat tamponu, 0,5 mL 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi karıştırılarak immobilize edilmiş HRP enziminden geçirilmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan ürünün (1 dk sonunda) 414 nm'de ( $\epsilon_{414nm}=31,1$  mM/cm) absorbansı UV/VIS spektrofotometresinde ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlardan Eşitlik 3.2.2.7.1'deki Lineweaver-Burk denklemi kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanmıştır.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.2.2.7.1)$$

### 3.2.2.8. Toplam antosiyanin tayini

*Prunella* L. türlerinin su, metanol ve bunların asidik ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarı pH farkı yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Sellappan ve ark. 2002). Bu yöntem için 0,025 mol/L pH 1,0 potasyum klorür çözeltisi ve 0,4 mol/L pH 4,5 sodyum asetat tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Her bir x mL ekstraktının pH değeri 1,0 ve 4,5 olacak şekilde, hazırlanan tampon çözeltiler kullanılarak ayarlanmıştır. Harcanan tampon hacminin değeri ekstraktlar için seyrelme faktörü (*SF*) olarak kaydedilir. 30 dk

beklenmiş ve süre sonunda hazırlanan her bir örnek için 510 ve 700 nm dalga boyunda absorbands değerleri ölçülmüştür. Okunan absorbands değerleri;

$$A=(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5} \quad (3.2.2.8.1)$$

$$\text{Antosiyanin konsantrasyonu (mg/L)}= A \times \text{MW} \times \text{SF} \times 1000 / (\epsilon \times l) \quad (3.2.2.8.2)$$

eşitliğinde yerine konarak herbir ekstrakt için absorbands değeri bulunmuştur. Siyanidin-3-glukozit için molekül kütlesi (MW) 449,2 g/mol, molar sönüm katsayısı ( $\epsilon$ ) 26900 ve küvet genişliği 1 cm olarak alınmıştır. Elde edilen değerler eşitlikte yerine konulmuştur. Ekstraktlar için toplam antosiyanin değeri mg siyanidin-3-glukozit/100 g örnek olarak verilmiştir.

### 3.2.2.9. ABTS yöntemi

*Prunella* L. türlerinden elde edilen ekstraktların toplam antioksidan aktivite tayini ABTS yöntemi kullanılarak yapılmıştır. ABTS yönteminde 7 mM ABTS sulu çözeltisi 2,45 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  ile karıştırılarak karanlıkta 12-16 saat bekletilmiştir. Süre sonunda elde edilen ABTS çözeltisi % 96'lık etanolle 1:10 oranında seyreltilmiştir. 4 mL etanol ve 1 mL ABTS karıştırılarak 6 dk sonunda 734 nm dalga boyunda kör örnek için absorbands değeri okunmuştur ( $A_{\text{kör}}$ ). Her bir ekstrakt veya fenol bileşiminden x mL alınır üzerine (4-x) mL etanol ve 1 mL ABTS çözeltisi ilave edilerek karıştırılmış, 6.dk sonunda 734 nm de absorbands değeri okunmuştur ( $A_{\text{örnek}}$ ). Ölçümler sonucunda hem de ekstraktlar hem de fenolik bileşikler için % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kör}}} \times 100 \quad (3.2.2.9.1)$$

ABTS yönteminde standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Her bir standardın 734 nm dalga boyunda absorbands grafiğe okunarak troloks miktarına (mg) göre grafiğe geçirilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak ekstraktların toplam antioksidan aktivite değerleri “mg troloks/g örnek” şeklinde hesaplanmıştır.

### 3.2.2.10. DPPH yöntemi

Ekstraktlar üzerine uygulanan diğer antioksidan aktivite tayin yöntemi fenolik bileşiklerin serbest radikalleri önleme yeteneğini ölçebilen DPPH kullanılarak gerçekleşen reaksiyon sonucu absorbansın spektrofotometrede 515 nm’de ölçülmesiyle yapılmıştır. Fenol veya ekstrakt çözeltilerinden alınan x mL örnek metanol içinde hazırlanmış, 1 mM DPPH çözeltisinin 0,18 mL’si ile karıştırılmış, toplam hacim metanol ile 3 mL’ye tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Test tüpü içerisindeki DPPH konsantrasyonu  $6 \times 10^{-5}$  M’dir. 30 dk karanlıkta bekletilmiş ve süre sonunda 515 nm dalga boyunda absorbans değeri okunmuştur ( $A_{\text{örnek}}$ ). Aynı işlem ekstrakt/fenol ilavesi yapılmadan kör örnek için 0,18 mL DPPH ve (3-0,18) mL metanol ilavesi ile tekrarlanmış ve okunan absorbans değeri  $A_{\text{kör}}$  olarak kaydedilmiştir. Ekstraktların % inhibisyon değeri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kör}}} \times 100 \quad (3.2.2.10.1)$$

DPPH yönteminde standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Her bir standardın 515 nm dalga boyunda absorbans grafiğe okunarak troloks miktarına (mg) göre grafiğe geçirilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak ekstraktların toplam antioksidan aktivite değerleri “mg troloks/g örnek” şeklinde hesaplanmıştır.

### 3.2.3. Kromatografik yöntemler

#### 3.2.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)

*Prunella* L türlerinde bulunan fenolik bileşikler HPLC-DAD ile analizinde, kolon olarak XBridge C18 (4,6×250 mm, i.d. 3,5 µm, Waters) kolon ile 10 µL’lik enjeksiyon hacminde 0,5 mL/dk akış hızı ile çalışılmıştır. Analiz sırasında asetonitril ve %1’lik sulu formik asitten oluşan gradient çözücü programı uygulanmıştır. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları Çizelge 3.2.3.1.1’de verilmektedir.

**Çizelge 3.2.3.1.1. HPLC-DAD için analiz çalışma koşulları**

Süre (dk)	Hareketli faz
0-10	%13 asetonitril, %87 %1'lik formik asit
10-20	%41,5 asetonitril, %58,5 %1'lik formik asit
20-25	%70 asetonitril, %30 %1'lik formik asit
25-35	%10 asetonitril, %90 %1'lik formik asit

### 3.2.3.2. Sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS)

Fenolik bileşiklerin LC-MS ile analizinde kolon olarak Zorbax SB C18 LC-MS kolonu (50 mm×4,6 mm, i.d. 1,8 µm) ile 10 µL'lik enjeksiyon hacminde 0,2 mL/dk akış hızı ile çalışıldı. Fenolik maddelerin kalitatif analizleri için ESI-pozitif modu kullanılmıştır. LC-MS için analiz çalışma koşulları Çizelge 3.2.3.2.1'de verilmektedir.

**Çizelge 3.2.3.2.1. LC-MS için analiz çalışma koşulları**

Süre (dk)	Hareketli faz
0-8	%70 %1'lik formik asit, %30 asetonitril
8-27	%50 %1'lik formik asit, %50 asetonitril
27-30	%70 %1'lik formik asit, %30 asetonitril

### 3.2.4. Kemometrik yöntemler

Bu çalışmada kemometrik yöntemler ile *Prunella L.* türleri ekstraktlarının toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite tayinleri yapılmıştır. Gerçek değerler ile tahmini değerler karşılaştırıldığında birbirleriyle uyumlu oldukları bulunmuştur. *Prunella L.* türlerinin ekstraksiyon çalışmalarında 6 farklı çözücü ve bu çözücülerin asidik çözeltileri de kullanılmıştır. Ekstraksiyon çalışmaları sonunda 96 adet ekstrakt elde edilmiştir (12 farklı çözücü×4 farklı tür×2 tekrar). Her bir ekstraktın HPLC-DAD ile kromatografik analizleri yapılmıştır. Bilgisayar ortamında her bir ekstraktın kromatografik verileri toplanmış ve tekrarlanan ekstraktlar için kromatogram ortalaması alınmıştır. Buna göre 48×1316 boyutlu veri matrisi elde edilmiştir. Bu matrisin oluşturulmasında verilerin sıralanması rasgele yapılmıştır. 48×1316 boyutlu veri matrisi; kalibrasyon seti

(32×1316) ve test seti (12×1316) olmak iki matrise bölünmüştür. Kemometrik hesaplamalarda kalibrasyon ve test seti kullanılmıştır.

Kemometrik yöntem ile toplam fenol tayinlerinde ham kromatogramlar, COW, sinyal düzleştirme, merkezileştirme, normalizasyon teknikleri ile analize hazırlanmıştır. Ön işlem gören kromatogramlara çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden PLS ve PCR uygulanmıştır. Hesaplamalar sonucunda hata hesaplarına göre hangi teknik ile sonuçların daha iyi tahmin edildiği bulunmuştur. Elde edilen skor ve loading değerlerine göre türler arasındaki grup oluşumları ve toplam fenole katkısı olan fenolik bileşikler belirlenmiştir.

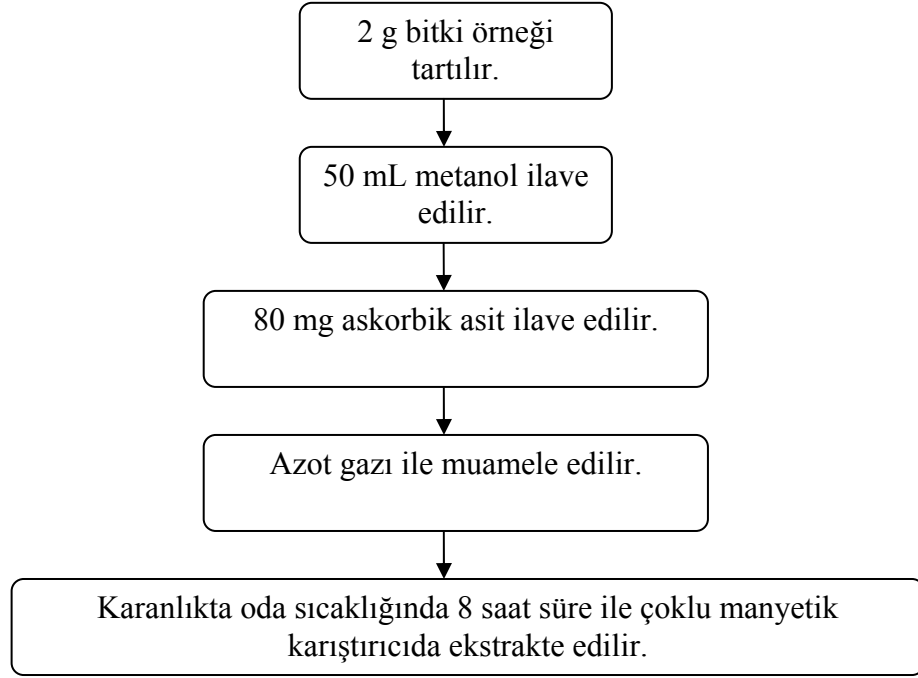
Kemometrik yöntem ile toplam antioksidan aktivite tayinlerinde ham kromatogramlar, COW, sinyal düzleştirme, merkezileştirme, normalizasyon teknikleri ile analize hazırlanmıştır. Ön işlem gören kromatogramlara çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden PLS ve OSC-PLS uygulanmıştır. Hesaplamalar sonucunda hata hesaplarına göre hangi teknik ile sonuçların daha iyi tahmin edildiği bulunmuştur. Elde edilen skor ve loading değerlerine göre türler arasındaki grup oluşumları ve toplam antioksidan aktiviteye katkısı olan fenolik bileşikler belirlenmiştir.

### **3.2.5. İzolasyon çalışmaları**

Bursa, Balıkesir ve Antalya illerinden toplanan *Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella vulgaris* L., *Prunella orientalis* Bornm, *Prunella grandiflora* L. türlerinin izolasyon çalışmalarında önce bunların metanol ile ekstraksiyonları yapılmıştır.



## Ekstraksiyon



Daha sonra elde edilen ekstraktın 15 mL'si Sephadex LH-20 kolon kromatografisi (1,5 × 37 cm, 13 g) ile izole edilmiştir. Sephadex LH-20 ile ilgili ayrıntılı bilgi Çizelge 3.2.5.1'de verilmektedir. Elde edilen metanol fraksiyonlarının (4 mL/tüp) 280 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Sonra tüp numaralarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kaç tane madde izole edildiğine karar verilmiştir. Daha sonra tüplerdeki fraksiyonlar birleştirilerek izole edilen fenolik madde gruplarının ayrılması sağlanmıştır. Hem fraksiyonların hem de ekstraktların HPLC-DAD ile kromatografik analizleri, toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite tayinleri yapılmıştır. Toplam fenol tayinleri Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayinleri ise ABTS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. HPLC-DAD analiz çalışma koşulları Bölüm 3.2.3.1'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

**Çizelge 3.2.5.1. Sephadex LH-20 özellikleri**

Özelliği	Çapraz bağlı dekstrandan oluşmuş reçine
Kullanım alanı	Lipitlerin, steroidlerin, yağ asitlerinin, hormonların ve vitaminlerin vs....adsorpsiyon kromatografisi ile ayrılması
Şişme özelliği	4 mL su/metanol içinde 1 g madde
pH aralığı	2-13
Tanecik boyutu	25-100 µm

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada sunulan bulgular dört ana başlıkta toplanabilir. Bunlar;

- Spektroskopik yöntemler,
- Kromatografik yöntemler,
- Kemometrik yöntemler,
- İzolasyon çalışmalarıdır.

### 4.1. Spektroskopik Yöntemler

*Prunella L.* türlerinin toplam fenol tayinleri, enzim immobilizasyonunun kontrol edilmesi, toplam antosiyanin tayini ve antioksidan aktivite tayinleri spektroskopik yöntemle yapılmıştır.

#### 4.1.1. Toplam fenol tayinleri

*Prunella L.* türlerinin toplam fenol tayinlerinde kullanılan kalibrasyon grafiklerine ait sonuçlar Çizelge 4.1.1.1'de verilmektedir.

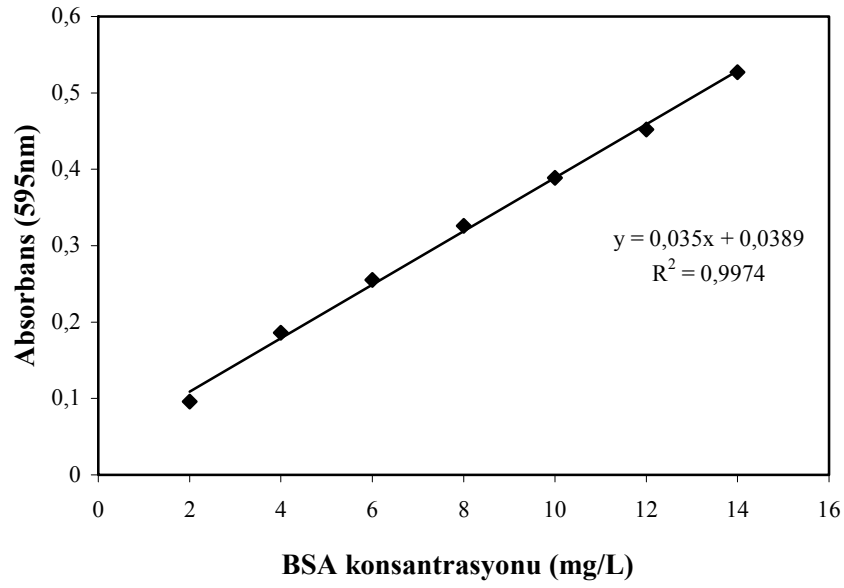
**Çizelge 4.1.1.1.** Toplam fenol tayinleri için kalibrasyon grafikleri

Yöntem	Kalibrasyon denklemleri	Regresyon katsayısı
Folin	$y = 0,0155x + 0,0267$	0,9991
Serbest enzim	$y = 0,2013x + 0,1700$	0,9943
İmmobilize enzim	$y = 0,0016x - 0,0051$	0,9944

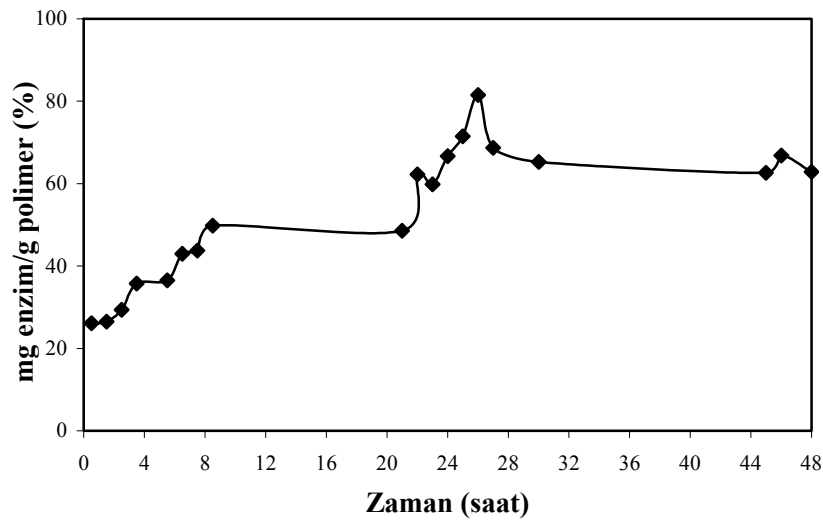
#### 4.1.2. Enzim immobilizasyonu

İmmobilizasyon zamanı enzim-destek maddesi arasındaki reaksiyona göre değişim gösterebilir. Önemli olan enzim ile destek maddesi arasında çok fazla noktadan kovalent etkileşim olmasıdır. Bu amaçla HRP enziminin optimum immobilizasyon süresini belirleyebilmek için 48 saat süreyle polimer üzerinden enzim geçirilmiştir. Belirli süreler sonundan enzim çözeltisinden örnek alınarak Bradford yöntemine göre protein

tayini yapılmıştır. Bradford yönteminde standart protein olarak bovin serum albumin konsantrasyonu ile absorbans değerleri arasında çizilen kalibrasyon grafiğine göre tüm örneklerdeki protein miktarları hesaplanarak g polimer başına tutunan mg enzim miktarı hesaplanmıştır. Bradford yönteminde kullanılan kalibrasyon grafiği Şekil 4.1.2.1’de, optimum immobilizasyon süresini belirlemek için immobilizasyon süresi ile g polimer başına tutunan enzim yüzdesi arasında çizilen grafik Şekil 4.1.2.2’de verilmektedir.

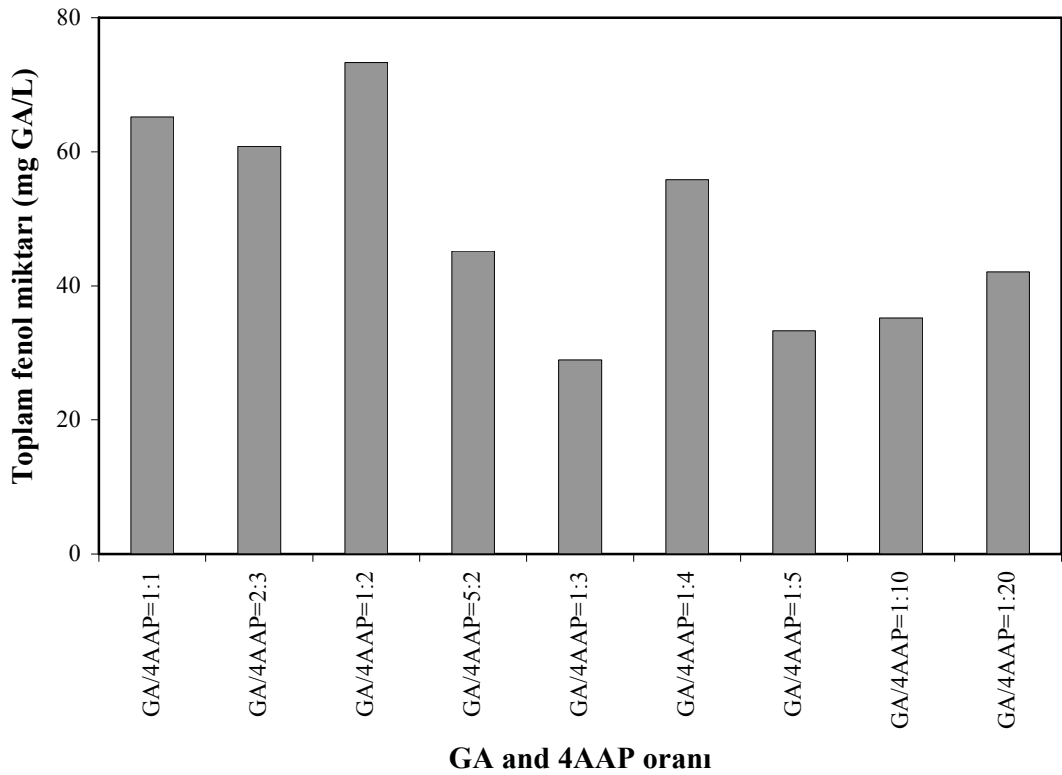


Şekil 4.1.2.1. Bradford yöntemi için kalibrasyon grafiği



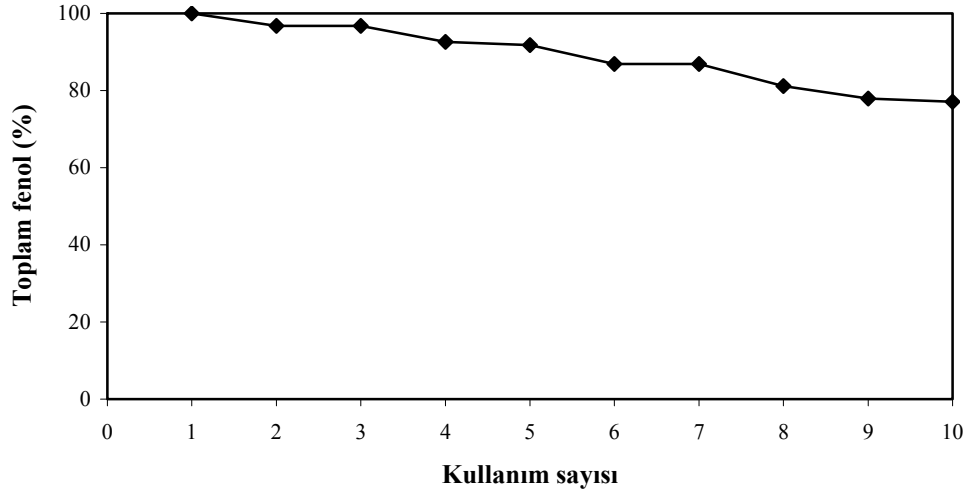
Şekil 4.1.2.2. Optimum immobilizasyon süresi

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında enzim tarafından yükseltgenen fenolik maddeler, 4-aminoantipirin yapısındaki aromatik amin grubuna saldırması sonucu kuinon-imin renkli ürünü elde edilir. Oluşan bu renkli ürünün miktarı örnekteki fenolik madde ve 4-aminoantipirin miktarına göre değişebilir. Bu amaçla hem Folin hem de enzimatik yöntemde kullanılan standart madde gallik asit seçilerek gallik asit/4-aminoantipirin oranının etkisi incelenmiştir. Kuinon imin renkli ürün miktarının gallik asit/4-aminoantipirin (GA/4AAP) molarite oranına göre değişimi Şekil 4.1.2.3’de verilmektedir.



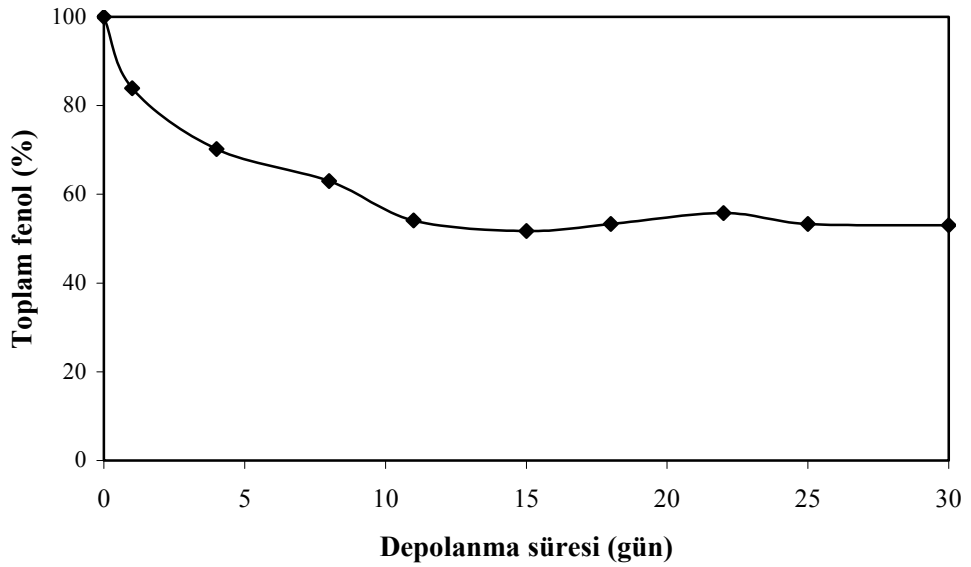
**Şekil 4.1.2.3.** İmmobilize HRP yöntemine gallik asit/4-aminoantipirin oranının etkisi

İmmobilize HRP enziminin optimum kullanım sayısını belirlemek amacıyla 0,1 M fosfat tamponunda (pH 8) hazırlanmış 0,45 mM 4-aminoantipirin içeren taşıyıcı çözelti 2,5 mL/dk hızla kolondan geçirilirken, 0,1 mL bitki ekstraktı ve 1 mL 2,97 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözelti karışımı 10 defa kolona verilmiştir. Kolondan geçirilirken oluşan enzimatik reaksiyon sonrası elde edilen kuinon-imin renkli ürününün 510 nm’de absorbansı UV/VIS spektrofotometresinde ölçülmüştür. Kullanım sayısının % toplam fenol değerine göre değişimi Şekil 4.1.2.4’de verilmektedir.



**Şekil 4.1.2.4.** İmmobilize HRP enziminin kullanım sayısının değişimi

Buzdolabında (4 °C’de) 30 gün süre ile bekletilen immobilize enzimin optimum depolanma süresini belirlemek amacıyla farklı zaman aralıklarında bitki ekstraktı kullanılarak enzimatik toplam fenol ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.1.2.5’de immobilize HRP enziminin depolanma süresi ile toplam fenol yüzdesi arasındaki değişim verilmektedir.



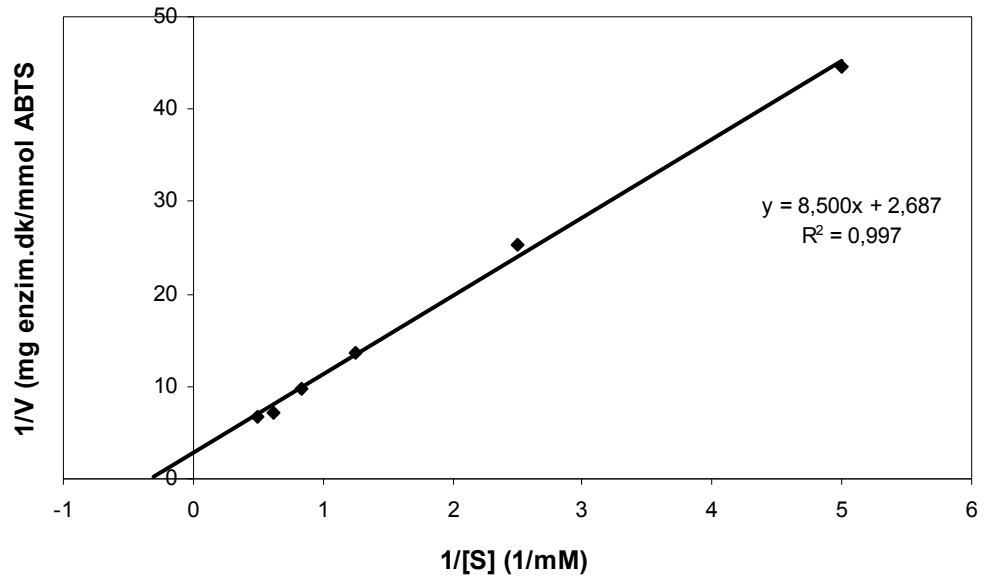
**Şekil 4.1.2.5.** İmmobilize HRP enziminin depolanma süresi ile toplam fenol yüzdesi arasındaki değişim

Serbest HRP enzimi için 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6; 2,0 mM konsantrasyonlarda ABTS çözeltisi kullanılarak aktivite tayini yapıldığında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.2.1’de verilmektedir.

**Çizelge 4.1.2.1.** Serbest HRP enzimi için [S] ve V değerleri

[S] (mM)	V (mM ABTS/ mg enzim.dk)	1/[S] (mM <sup>-1</sup> )	1/V (mg enzim.dk/ mM ABTS)
0,2	0,022	5	44,53
0,4	0,039	2,5	25,32
0,8	0,073	1,25	13,74
1,2	0,104	0,83	9,64
1,6	0,140	0,625	7,14
2	0,148	0,5	6,77

Şekil 4.1.2.6’da Çizelge 4.1.2.1’deki değerler kullanılarak Lineweaver-Burk denklemine göre çizilen grafik görülmektedir.



**Şekil 4.1.2.6.** Serbest HRP enzimi için çizilen Lineweaver-Burk denklemini grafiği

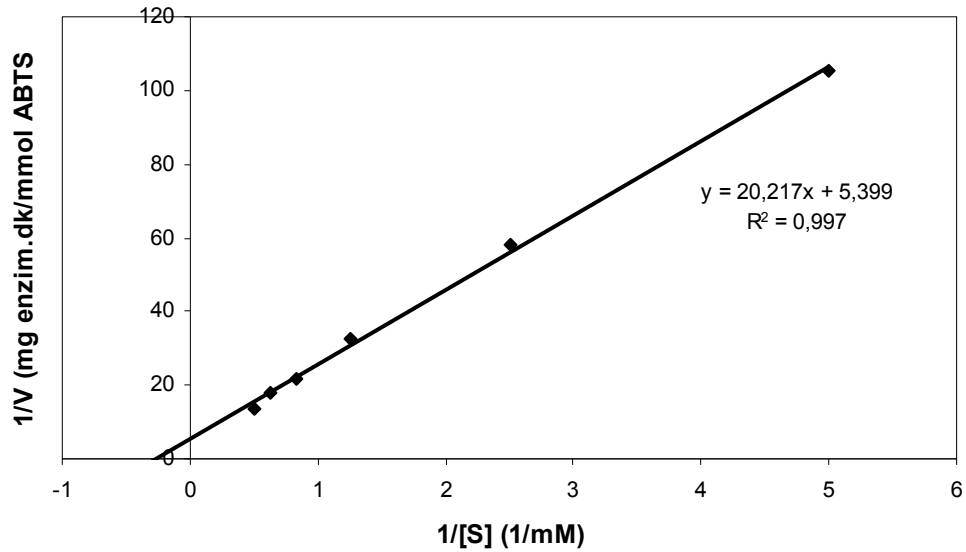
Çizilen grafik yardımıyla serbest enzim için  $K_m$  değeri 3,16 mM,  $V_{max}$  değeri 0,37 mmol ABTS/mg enzim.dk olarak belirlenmiştir.

STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enzimi için 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6; 2,0 mM konsantrasyonlarda ABTS çözeltisi kullanılarak aktivite tayini yapıldığında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.2.2’de verilmektedir.

**Çizelge 4.1.2.2.** STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enzimi için [S] ve V değerleri

[S] (mM)	V (mM ABTS/ mg enzim.dk)	1/[S] (mM <sup>-1</sup> )	1/V (mg enzim.dk/ mM ABTS)
0,2	0,010	5	105,12
0,4	0,017	2,5	58,33
0,8	0,030	1,25	32,84
1,2	0,046	0,83	21,52
1,6	0,057	0,625	17,68
2	0,075	0,5	13,39

Şekil 4.1.2.7’de Çizelge 4.1.2.2’deki değerler kullanılarak Lineweaver-Burk denklemine göre çizilen grafik görülmektedir.



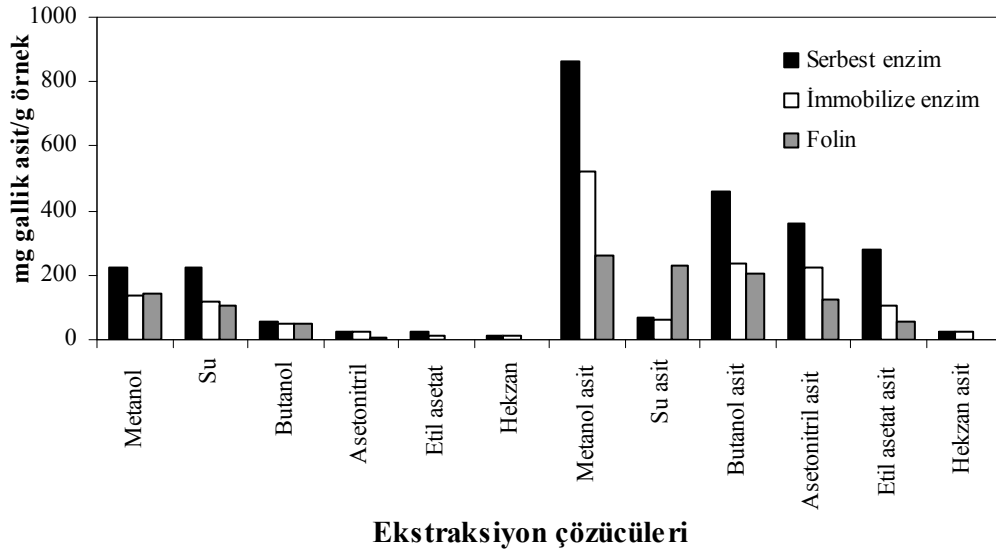
**Şekil 4.1.2.7.** STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enzimi için çizilen Lineweaver-Burk denklemi grafiği

Çizilen grafik yardımıyla STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enzimi için  $K_m$  değeri 3,74 mM,  $V_{max}$  değeri 0,19 mmol ABTS/mg enzim dk olarak belirlenmiştir.

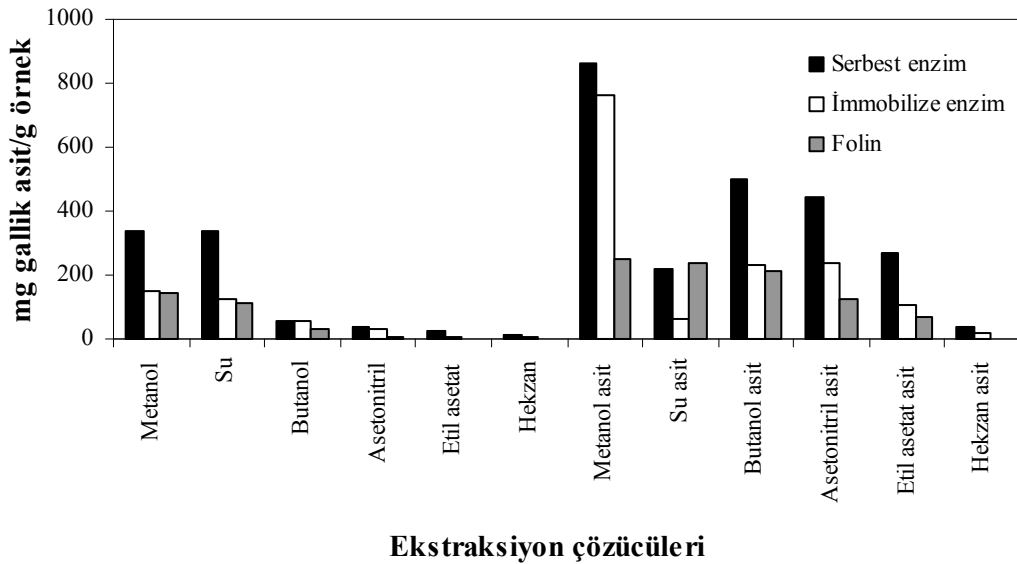


#### 4.1.3. Toplam fenol miktarları

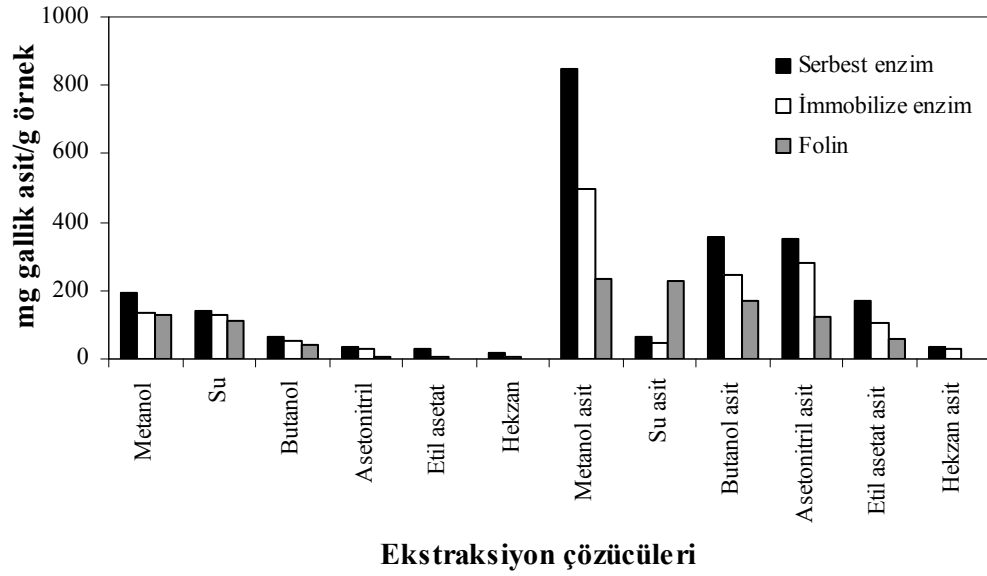
2007 yılında toplanan *Prunella L.* türlerinin su, metanol, butanol, asetonitril, etil asetat, hekzan ve bunların asidik ekstraktlarının toplam fenol miktarları Folin ve enzimatik yöntemle tayin edilmiştir. Bulunan toplam fenol miktarları Şekil 4.1.3.1-4.1.3.4'te verilmektedir.



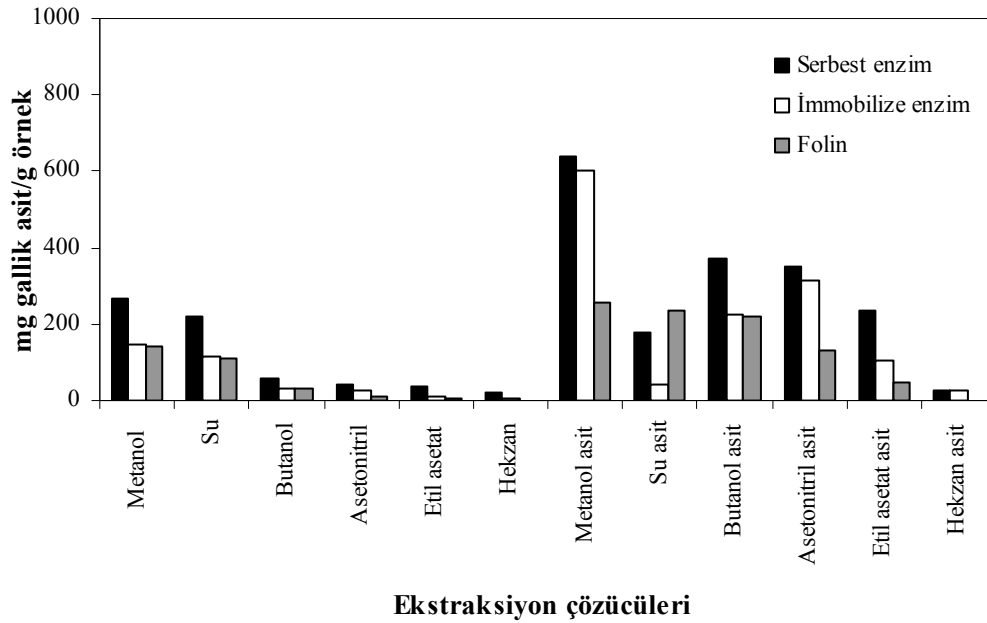
Şekil 4.1.3.1. *Prunella laciniata* (L.) L. için toplam fenol miktarları



Şekil 4.1.3.2. *Prunella vulgaris* L. için toplam fenol miktarları



Şekil 4.1.3.3. *Prunella orientalis* Bormm. için toplam fenol miktarları



Şekil 4.1.3.4. *Prunella grandiflora* L. için toplam fenol değerleri

#### 4.1.4. Toplam antosiyanin miktarları

*Prunella* L. türlerinin asidik su ekstraktlarının toplam fenol miktarları ise serbest ve immobilize enzim yöntemlerine göre Folin yöntemi ile daha yüksek bulunmuştur. Bu durum asidik su örneklerinde diğer ekstraktlara göre yüksek miktarda antosiyanin

bulunmasından kaynaklanır. Bu nedenle su, metanol ve bunların asidik ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarı ölçülmüştür (Çizelge 4.1.4.1).

**Çizelge 4.1.4.1.** Toplam antosiyanin miktarları

Ekstrakt	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. (mg of siyanidin-3-glikozit / 100 g örnek)	<i>Prunella vulgaris</i> L. (mg of siyanidin-3-glikozit/100 g örnek)	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. (mg of siyanidin-3-glikozit/100 g örnek)	<i>Prunella grandiflora</i> L. (mg of siyanidin-3-glikozit/100 g örnek)
Su-asit	7,67 ± 0,16	10,91 ± 0,10	2,85 ± 0,10	4,93 ± 0,10
Metanol-asit	6,69 ± 0,18	8,17 ± 0,13	1,47 ± 0,04	3,66 ± 0,13
Su	0,75 ± 0,05	1,43 ± 0,05	0,56 ± 0,02	0,63 ± 0,05
Metanol	1,96 ± 0,06	3,65 ± 0,09	0,86 ± 0,03	1,34 ± 0,12

#### 4.1.5. Toplam antioksidan aktivite tayinleri

2009 yılında toplanan *Prunella* L. türlerinin ekstraktlarının ABTS ve DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivite tayinleri yapılmıştır. ABTS ve DPPH yöntemlerinde kullanılan kalibrasyon grafiklerine ait veriler Çizelge 4.1.5.1’de verilmektedir. Çizelge 4.1.5.2’de ABTS yöntemi ile Çizelge 4.1.5.3’de DPPH yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan aktivite sonuçları verilmiştir. Antioksidan aktivite sonuçları mg troloks/g örnek şeklinde hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.1.5.1.** Toplam antioksidan aktivite tayinleri için kalibrasyon grafikleri

Yöntem	Kalibrasyon denklemi	Regresyon katsayısı
ABTS	$y = 2261,6x + 0,3844$	0,999
DPPH	$y = 9107,8x + 0,3582$	0,999

**Çizelge 4.1.5.2.** *Prunella* L. ekstraktlarının ABTS yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan aktivite değerleri

Ekstrakt	<i>Prunella vulgaris</i> L. (mg troloks/ g örnek)	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. (mg troloks/ g örnek)	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. (mg troloks/ g örnek)	<i>Prunella grandiflora</i> L. (mg troloks/ g örnek)
Metanol	166,11 ± 4,19	151,24 ± 3,46	201,04 ± 0,43	188,63 ± 3,36
Su	117,73 ± 0,59	121,95 ± 1,00	131,79 ± 1,94	123,38 ± 0,94
Butanol	53,32 ± 1,61	48,30 ± 0,19	44,70 ± 1,02	57,08 ± 3,21
Asetonitril	22,26 ± 0,66	22,48 ± 0,58	14,44 ± 0,16	18,18 ± 0,49
Etil asetat	5,59 ± 0,40	4,08 ± 0,53	10,74 ± 0,90	5,67 ± 0,23
Hekzan	0,80 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,53 ± 0,04
Metanol-asit	343,57 ± 2,13	329,58 ± 0,85	329,05 ± 1,72	298,23 ± 2,11
Su-asit	215,21 ± 0,90	208,89 ± 1,47	248,38 ± 6,97	201,64 ± 0,74
Butanol-asit	102,07 ± 0,17	102,53 ± 0,73	87,17 ± 2,45	81,73 ± 1,77
Asetonitril-asit	37,32 ± 0,21	37,23 ± 0,32	35,39 ± 0,06	37,83 ± 0,06
Etil asetat-asit	33,32 ± 0,16	33,89 ± 0,12	33,57 ± 0,65	31,30 ± 0,08
Hekzan-asit	1,46 ± 0,01	0,69 ± 0,08	1,72 ± 0,03	1,35 ± 0,03

**Çizelge 4.1.5.3.** *Prunella* L. ekstraktlarının DPPH yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan aktivite değerleri

Ekstrakt	<i>Prunella vulgaris</i> L. (mg troloks/ g örnek)	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. (mg troloks/ g örnek)	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. (mg troloks/ g örnek)	<i>Prunella grandiflora</i> L. (mg troloks/ g örnek)
Metanol	151,82 ± 1,58	134,20 ± 5,09	118,79 ± 1,57	122,52 ± 1,63
Su	92,33 ± 1,54	84,03 ± 0,78	85,89 ± 1,24	97,20 ± 1,91
Butanol	53,90 ± 1,47	63,00 ± 0,42	65,07 ± 1,46	76,64 ± 1,65
Asetonitril	24,13 ± 1,44	24,18 ± 0,42	26,22 ± 1,54	32,70 ± 1,29
Etil asetat	7,46 ± 0,38	5,65 ± 1,03	11,50 ± 1,15	10,36 ± 0,17
Hekzan	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Metanol-asit	219,35 ± 4,71	220,47 ± 2,49	256,52 ± 2,80	237,94 ± 2,14
Su-asit	118,76 ± 1,68	107,21 ± 2,19	108,37 ± 4,12	103,00 ± 2,42
Butanol-asit	88,84 ± 1,81	94,49 ± 1,98	86,05 ± 2,04	92,90 ± 0,96
Asetonitril-asit	73,23 ± 1,20	73,76 ± 1,09	72,24 ± 0,78	73,53 ± 0,35
Etil asetat-asit	62,20 ± 0,72	67,23 ± 0,30	67,21 ± 1,21	67,52 ± 1,91
Hekzan-asit	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,07 ± 0,01

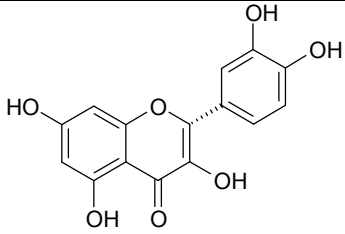
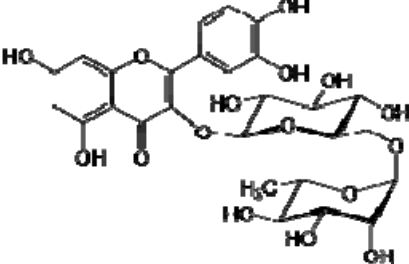
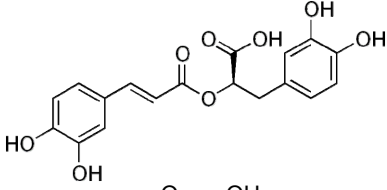
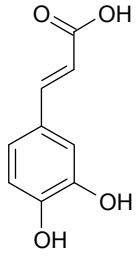
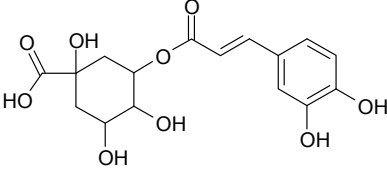
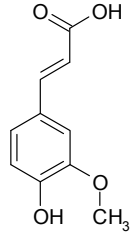
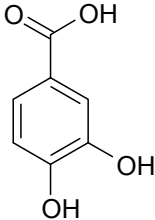
## 4.2. Kromatografik Yöntemler

HPLC-DAD cihazı için standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. 100 mg/L stok çözelti kullanılarak kuersetin, rutin, rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit ve protokatekuik asit standart fenolik bileşikler için 1, 2, 4, 8,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 mg/L standart çözeltileri hazırlanmıştır. Bu standart fenolik maddeler için konsantrasyona karşılık pik alan değerleri ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (Çizelge 4.2.1). HPLC-DAD cihazında dalgaboyu protokatekuik asit için 280 nm, diğer fenolik maddeler için 360 nm seçilmiştir. Çizelge 4.2.2’de bu fenolik maddelere ait kimyasal yapı formülleri ve molekül kütleleri verilmektedir.

**Çizelge 4.2.1.** Standart fenolik maddeler için HPLC-DAD kalibrasyon grafikleri

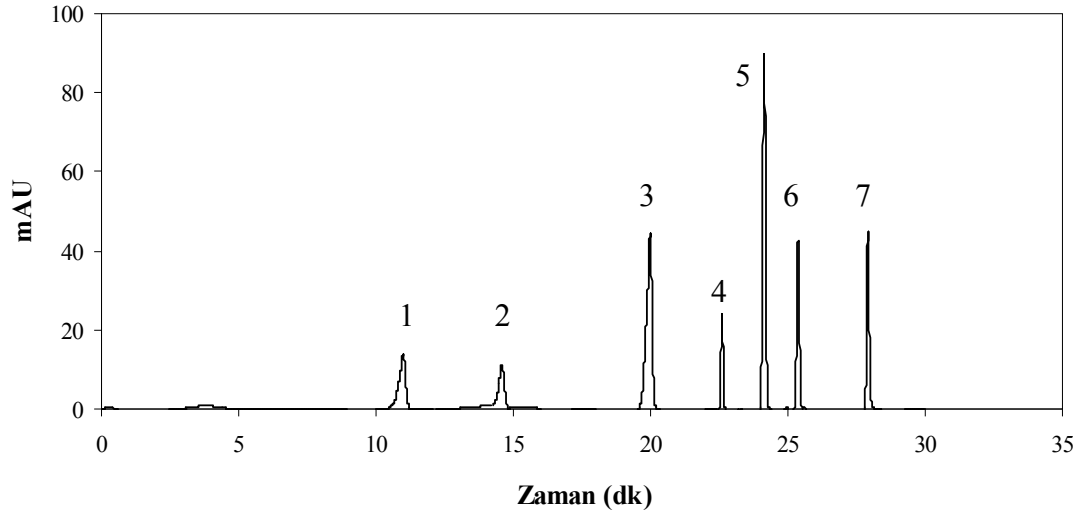
Standart madde	Kalibrasyon grafiği	Regresyon katsayısı
Kuersetin	$y = 80,941x - 52,784$	0,999
Rutin	$y = 31,48x - 3,3214$	0,998
Rosmarinik asit	$y = 15,239x - 5,7702$	0,999
Kafeik asit	$y = 19,545x - 18,456$	0,999
Klorojenik asit	$y = 8,0335x + 2,8187$	0,998
Ferulik asit	$y = 15,392x - 0,9949$	0,999
Protokatekuik asit	$y = 25,782x + 2,9082$	0,999

**Çizelge 4.2.2. Standart fenolik maddeler**

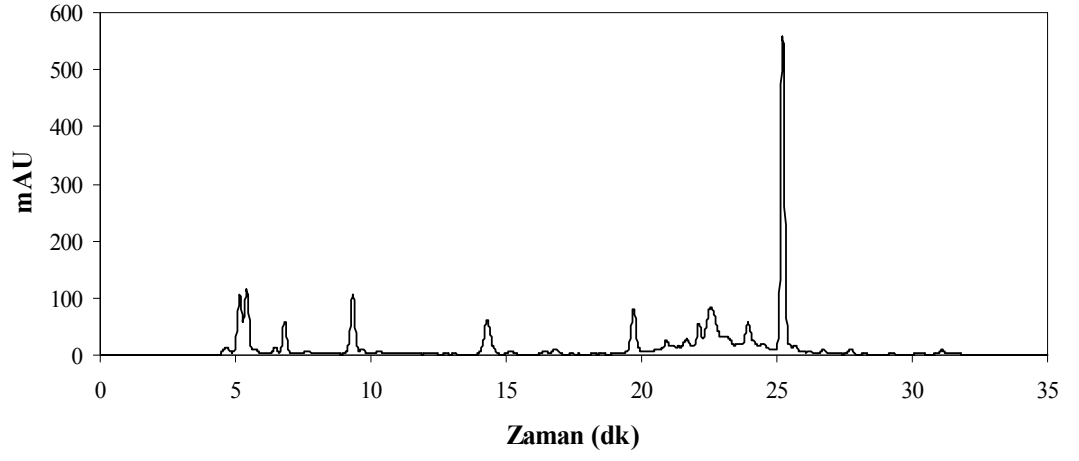
Fenolik madde	Kimyasal yapısı	Molekül kütlesi (g/mol)
Kuersetin		302,23
Rutin		610,52
Rosmarinik asit		360,31
Kafeik asit		180,16
Klorojenik asit		354,31
Ferulik asit		194,18
Protokatekuik asit		154,12

#### 4.2.1. *Prunella L.* türlerinde bulunan fenolik maddeler

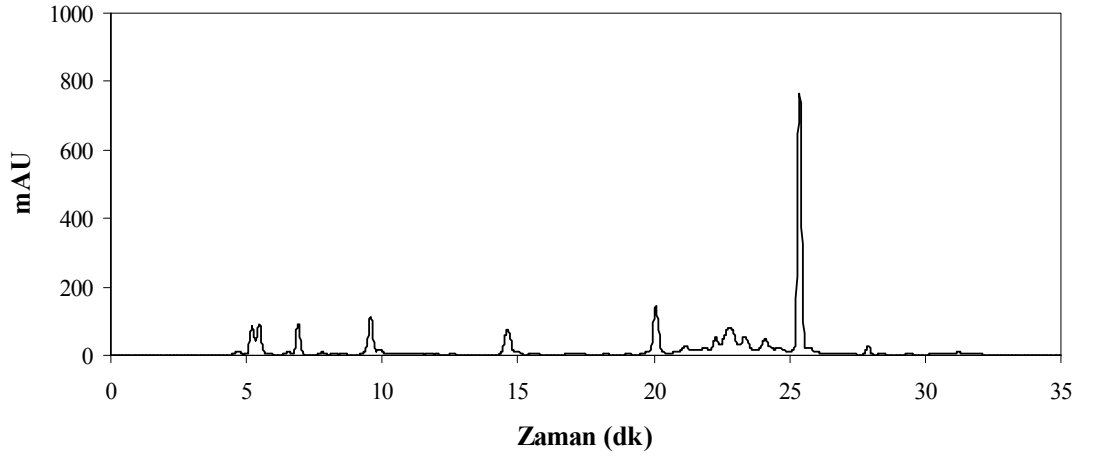
2009 yılında toplanan *Prunella L.* türlerinde HPLC-DAD analizleri sonucunda bulunan fenolik maddeler; kuersetin, rutin, rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit ve protokatekuik asittir. Şekil 4.2.1.1’de standart 10 mg/L fenolik maddelere ait HPLC kromatogramı, Şekil 4.2.1.2-4.1.2.5’de *Prunella L.* türlerinin su-asit ekstraktlarına ait HPLC kromatogramları verilmektedir. *Prunella L.* türlerinde bulunan fenolik maddelerin miktarları da Çizelge 4.2.1.1 ve Çizelge 4.2.1.2’de verilmektedir. Çizelge 4.2.1.1’de ekstraksiyon yöntemine göre, Çizelge 4.2.1.2’de asidik hidroliz yöntemine göre bulunan fenolik madde miktarları bulunmaktadır.



**Şekil 4.2.1.1.** Standart 10 mg/L fenolik maddelere ait HPLC kromatogramı (1; protokatekuik asit, 2; klorojenik asit, 3; kafeik asit, 4; rutin, 5; ferulik asit, 6; rosmarinik asit, 7; kuersetin)

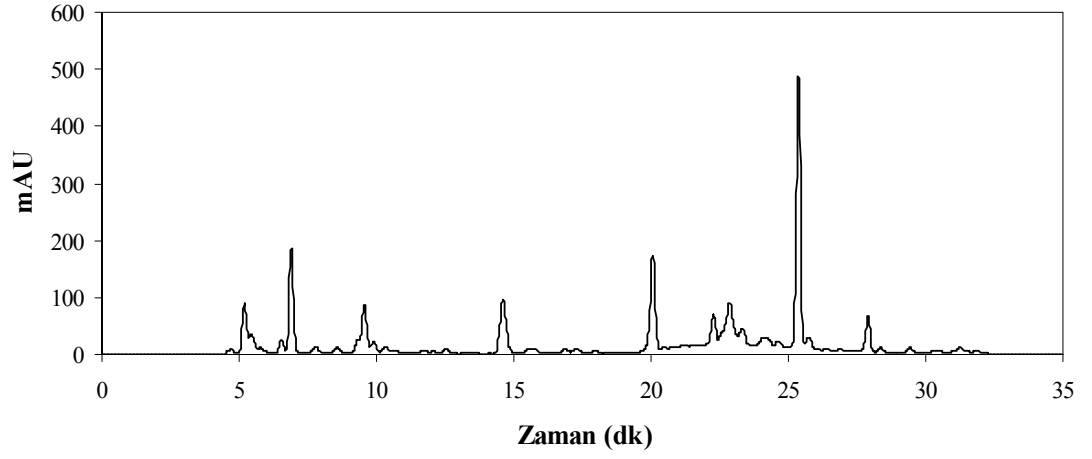


Şekil 4.2.1.2. *Prunella vulgaris* L. su-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı

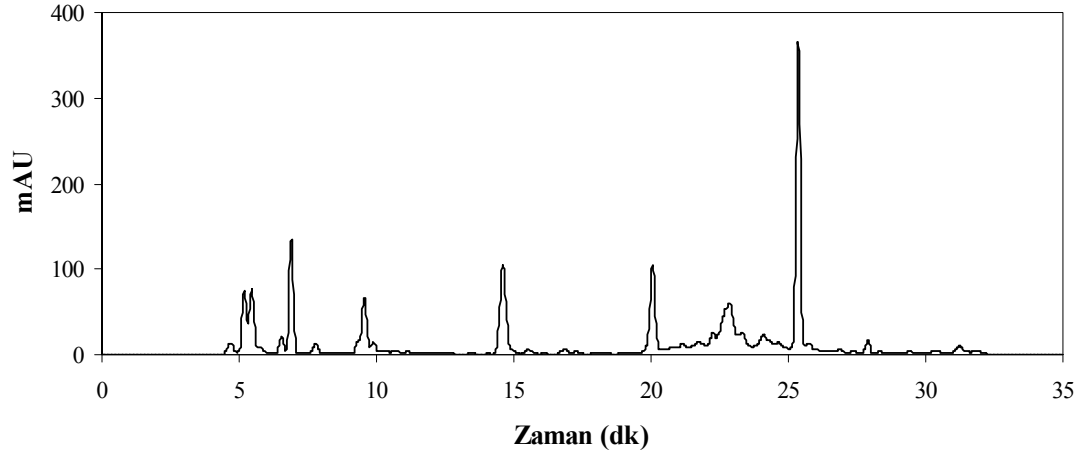


Şekil 4.2.1.3. *Prunella laciniata* (L.) L. su-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı





**Şekil 4.2.1.4.** *Prunella grandiflora* L. su-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı



**Şekil 4.2.1.5.** *Prunella orientalis* Bornm. su-asit ekstraktına ait HPLC kromatogramı

**Çizelge 4.2.1.1.** Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak *Prunella L.* türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/g örnek)

	KU	RU	RA	KA	KL	FA	PKA	Toplam
PVS	x	0,61 ± 0,01	9,46 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,01	x	x	10,68 ± 0,04
PVM	x	1,27 ± 0,05	21,85 ± 0,45	x	x	x	x	23,12 ± 0,45
PVB	x	0,10 ± 0,01	1,19 ± 0,01	x	x	x	x	1,29 ± 0,01
PVA	x	x	2,32 ± 0,01	x	x	x	x	2,32 ± 0,01
PVE	x	0,07 ± 0,01	2,78 ± 0,01	x	x	x	x	2,85 ± 0,01
PVH	x	x	x	x	x	x	x	x
PLS	x	0,76 ± 0,01	18,81 ± 0,17	0,26 ± 0,01	0,45 ± 0,01	2,04 ± 0,02	x	22,32 ± 0,17
PLM	x	1,01 ± 0,03	17,94 ± 0,42	x	x	x	x	18,95 ± 0,42
PLB	x	0,12 ± 0,01	1,31 ± 0,01	x	x	x	x	1,43 ± 0,01
PLA	x	x	1,28 ± 0,01	x	x	x	x	1,28 ± 0,01
PLE	x	x	0,84 ± 0,01	x	x	x	x	0,84 ± 0,01
PLH	x	x	x	x	x	x	x	x
PGS	0,36±0,01	1,53 ± 0,02	15,24 ± 0,18	x	x	x	0,11 ± 0,01	17,23 ± 0,18
PGM	x	6,74 ± 0,14	21,83 ± 0,38	0,11 ± 0,01	x	0,21 ± 0,01	x	28,88 ± 0,41
PGB	x	0,22 ± 0,01	1,07 ± 0,01	x	x	x	x	1,29 ± 0,01
PGA	x	x	0,70 ± 0,01	x	x	x	x	0,70 ± 0,01
PGE	x	0,14 ± 0,01	1,93 ± 0,01	x	x	x	x	2,07 ± 0,01
PGH	x	x	x	x	x	x	x	x
POS	x	0,45 ± 0,01	5,42 ± 0,05	0,39 ± 0,01	0,14 ± 0,01	1,26 ± 0,01	0,08 ± 0,01	7,71 ± 0,05
POM	x	0,99 ± 0,01	9,63 ± 0,11	x	x	0,41 ± 0,01	x	11,02 ± 0,11
POB	x	0,06 ± 0,01	0,91 ± 0,01	x	x	x	x	0,97 ± 0,01
POA	x	x	0,83 ± 0,01	x	x	x	x	0,83 ± 0,01
POE	x	x	0,24 ± 0,01	x	x	x	x	0,24 ± 0,01
POH	x	x	x	x	x	x	x	x

İki tekrarın ortalaması ± standart sapma

*KU* kuersetin, *RU* rutin, *RA* rosmarinik asit, *KA* kafeik asit, *KL* klorojenik asit, *FA* ferulik asit, *PKA* protokatekuik asit, *PV* *Prunella vulgaris L.*, *PL* *Prunella laciniata L.*, *PO* *Prunella orientalis* Bornm., *PG* *Prunella grandiflora L.*, *S* su, *M* metanol, *B* butanol, *A* asetonyitril, *E* etil asetat, *H* hekzan, *x* tayin edilemedi.

**Çizelge 4.2.1.2.** Asidik hidroliz yöntemi kullanılarak *Prunella L.* türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları (mg/g örnek)

	KU	RU	RA	KA	KL	FA	PKA	Toplam
PVSA	0,19 ± 0,01	2,29 ± 0,01	9,53 ± 0,05	0,91 ± 0,02	x	0,25 ± 0,01	0,07 ± 0,01	13,23 ± 0,06
PVMA	1,70 ± 0,01	3,88 ± 0,09	4,55 ± 0,05	x	x	x	x	10,14 ± 0,10
PVBA	0,79 ± 0,01	4,01 ± 0,05	5,69 ± 0,08	x	0,52 ± 0,02	x	x	11,01 ± 0,10
PVAA	2,10 ± 0,14	x	38,28 ± 0,68	0,47 ± 0,01	x	x	x	40,85 ± 0,69
PVEA	2,10 ± 0,26	1,45 ± 0,06	13,32 ± 0,67	0,73 ± 0,05	0,19 ± 0,09	x	x	17,79 ± 0,73
PVHA	x	x	x	x	x	x	x	x
PLSA	0,72 ± 0,01	2,04 ± 0,04	13,17 ± 0,22	1,61 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,06 ± 0,01	18,63 ± 0,23
PLMA	2,92 ± 0,05	2,49 ± 0,11	4,32 ± 0,11	x	x	x	x	9,73 ± 0,16
PLBA	2,30 ± 0,07	3,12 ± 0,02	5,50 ± 0,01	x	0,82 ± 0,01	x	x	11,74 ± 0,07
PLAA	3,52 ± 0,07	x	39,19 ± 0,48	0,64 ± 0,01	x	x	x	43,36 ± 0,49
PLEA	4,31 ± 0,02	0,27 ± 0,01	11,78 ± 0,06	0,90 ± 0,01	x	x	x	17,26 ± 0,07
PLHA	x	x	x	x	x	x	x	x
PGSA	1,09 ± 0,06	3,96 ± 0,13	8,79 ± 0,29	1,82 ± 0,05	x	0,56 ± 0,01	0,09 ± 0,01	16,31 ± 0,03
PGMA	5,51 ± 0,23	3,93 ± 0,01	3,49 ± 0,02	1,13 ± 0,03	x	x	x	14,07 ± 0,23
PGBA	5,24 ± 0,03	7,13 ± 0,02	5,71 ± 0,03	x	1,07 ± 0,03	x	x	19,15 ± 0,06
PGAA	5,18 ± 0,01	x	36,45 ± 0,04	1,80 ± 0,01	x	x	x	43,43 ± 0,04
PGEA	6,41 ± 0,11	x	12,99 ± 0,21	1,30 ± 0,05	x	x	0,08 ± 0,01	20,77 ± 0,24
PGHA	x	x	x	x	x	x	x	x
POSA	0,31 ± 0,01	1,06 ± 0,03	6,46 ± 0,18	1,14 ± 0,04	x	0,45 ± 0,01	x	9,43 ± 0,19
POMA	1,56 ± 0,11	0,93 ± 0,08	2,00 ± 0,27	x	x	x	x	4,49 ± 0,30
POBA	1,65 ± 0,01	1,98 ± 0,01	3,55 ± 0,04	x	0,65 ± 0,01	x	x	7,82 ± 0,04
POAA	1,58 ± 0,14	6,52 ± 0,06	18,95 ± 0,14	0,82 ± 0,03	x	2,79 ± 0,08	x	30,67 ± 0,22
POEA	1,74 ± 0,02	2,24 ± 0,02	6,92 ± 0,05	0,74 ± 0,01	x	x	x	11,64 ± 0,06
POHA	x	x	x	x	x	x	x	x

İki tekrarın ortalaması ± standart sapma

*KU* kuersetin, *RU* rutin, *RA* rosmarinik asit, *KA* kafeik asit, *KL* klorojenik asit, *FA* ferulik asit, *PKA* protokatekuik asit, *PV* *Prunella vulgaris L.*, *PL* *Prunella laciniata L.*, *PO* *Prunella orientalis* Bornm., *PG* *Prunella grandiflora L.*, *SA* su-asit, *MA* metanol-asit, *BA* butanol-asit, *AA* asetonitril-asit, *EA* etil asetat-asit, *HA* hekzan-asit, *x* tayin edilemedi.

#### 4.2.2. Analitik yöntem validasyonu

*Prunella* L. türlerinin fenolik bileşiklerinin miktarsal tayinlerinin validasyonunda her fenolik bileşiğin LOD (3s/m), LOQ (10s/m) ve % geri kazanım değerleri (Çizelge 4.2.2.1) hesaplanmıştır. Burada s; tekrarlanan deneylerin standart sapmasını, m; kalibrasyon eğrisinin eğim değerini ifade etmektedir. Ekstraksiyon yönteminin geri kazanım değerinin ve uygulanan analitik yöntemin validasyonunun hesaplanabilmesi için 100 mg/L çözelti kullanılmıştır. Bu çözülden % geri kazanım değerinin hesaplanmasında içerisinde 10 mg/L standart madde içeren ekstraktlar kullanılmıştır. Bu ekstraktlar, *Prunella vulgaris* L. türünün metanol ve metanol-asit ekstraktlarıdır. Uygulanan analitik yöntemin validasyonunda kullanılan çözeltiler stok ana çözelti kullanılarak her bir standart fenolik bileşik için 1 mg/L derişimine sahip çözeltilerdir.

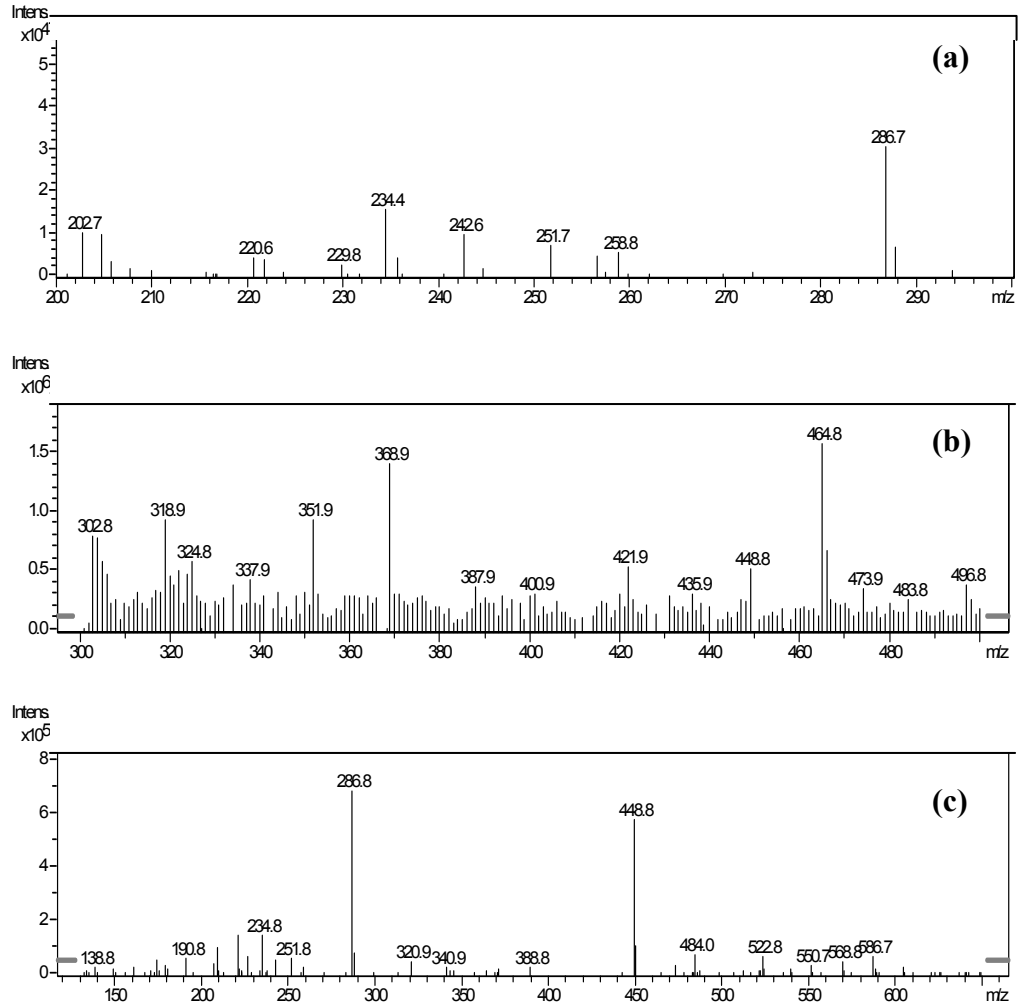
**Çizelge 4.2.2.1.** Analitik yöntem validasyonu ve geri kazanım değerleri

Fenolik bileşikler	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Geri kazanım (%)	
			Ekstraksiyon	Asidik hidroliz
Kuersetin	0,07	0,23	102 ± 2	99 ± 2
Rutin	0,11	0,36	82 ± 3	51 ± 1
Rosmarinik asit	0,08	0,27	95 ± 2	91 ± 4
Kafeik asit	0,08	0,26	88 ± 4	74 ± 3
Klorojenik asit	0,13	0,44	90 ± 4	87 ± 4
Ferulik asit	0,14	0,47	102 ± 2	102 ± 1
Protokatekuik asit	0,13	0,43	94 ± 4	99 ± 1

*LOD* tayin sınırı, *LOQ* tayin edilebilen en küçük derişim

### 4.2.3. LC-MS analizleri

HPLC-DAD analizi ile belirlenemeyen *Prunella* L. türlerinde bulunabilecek muhtemel fenolik maddeler LC-MS ile kalitatif olarak belirlendi. LC-MS cihazı ile *Prunella vulgaris* L. ve *Prunella laciniata* (L.) L. türlerinin su, su-asit, metanol, metanol-asit, etil asetat ve etil asetat-asit ekstraktları analiz edildi. LC-MS analizleri sonucu *Prunella* L. türlerinde bulunabilecek muhtemel fenolik maddeler; kamferol glikozit, kuersetin glikozit ve kamferoldür. Bu fenolik maddelere ait MS spektrumları Şekil 4.2.3.1’de gösterilmektedir. Çizelge 4.2.3.1’de *Prunella* L. türlerinde bulunabilecek muhtemel fenolik maddeler belirtilmektedir.



Şekil 4.2.3.1. LC-MS spektrumları; a) kamferol (17,7 dk), b) kuersetin glikozit (3,5 dk), kamferol glikozit (3,8 dk)

**Çizelge 4.2.3.1.** *Prunella* L. türlerinde bulunabilecek muhtemel fenolik maddeler

Ekstrakt		Kamferol glikozit	Kuersetin glikozit	Kamferol
<i>Prunella vulgaris</i> L.	Su	-	-	-
	Su-asit	-	+	-
	Metanol	+	-	-
	Metanol-asit	-	-	+
	Etil asetat	-	-	-
	Etil asetat-asit	-	-	-
<i>Prunella laciniata</i> (L.) L.	Su	-	+	-
	Su-asit	-	+	-
	Metanol	-	-	+
	Metanol-asit	-	-	-
	Etil asetat	-	-	-
	Etil asetat-asit	-	-	-

(-) kalitatif olarak tayin edilemedi, (+) kalitatif olarak tayin edildi

### 4.3. Kemometrik Yöntemler

#### 4.3.1. Toplam fenol tayinleri

*Prunella* L. türlerinin kemometrik yöntemler kullanılarak toplam fenol tayinleri yapılmıştır. Burada ham kromatogramlar, COW, sinyal düzeltme, merkezileştirme, normalizasyon teknikleri ile analize hazırlanmıştır. Ön işlem gören kromatogramlara çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden PLS ve PCR uygulanmıştır. PLS ve PCR algoritmalarında önemli bir faktör olan optimum bileşen sayısı çapraz validasyon (cross validation) yöntemiyle belirlenmiştir. Kalibrasyon seti için optimum bileşen sayısı 6 olarak belirlendi. PLS ve PCR hesaplamaları ile *Prunella* L. ekstraktlarının toplam fenol değerleri bulunmuştur. Bu tahmini toplam fenol değerleri Folin yöntemi ile bulunan gerçek toplam fenol değerleri (Çizelge 4.3.1.1) ile karşılaştırılmıştır. Buna göre toplam fenol değerleri için % hata değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.3.1.2). Kemometrik hesaplamalarda kullanılan gerçek değerler (Folin yöntemi ile bulunan toplam fenol değerleri) 2009 yılında toplanan bitki örneklerinin toplam fenol değerleridir. Folin yönteminde kullanılan kalibrasyon grafiği  $y = 0,0762 x + 0,0405$ , regresyon katsayısı ise 0,996'dır.

**Çizelge 4.3.1.1.** Folin yöntemi ile bulunan toplam fenol değerleri

Ekstrakt	<i>Prunella vulgaris</i> L. (mg gallik asit/g örnek)	<i>Prunella laciniata</i> (L.) L. (mg gallik asit/g örnek)	<i>Prunella orientalis</i> Bornm. (mg gallik asit/g örnek)	<i>Prunella grandiflora</i> L. (mg gallik asit/g örnek)
Metanol	15,48 ± 0,03	20,21 ± 1,35	11,00 ± 0,12	24,63 ± 0,55
Su	11,52 ± 0,55	11,69 ± 1,36	8,44 ± 0,56	16,93 ± 0,02
Butanol	13,97 ± 0,70	13,02 ± 0,92	9,65 ± 0,64	12,56 ± 0,46
Asetonitril	4,18 ± 0,28	1,97 ± 0,07	1,66 ± 0,05	1,82 ± 0,03
Etil asetat	2,09 ± 0,28	1,76 ± 0,02	1,89 ± 0,63	2,84 ± 0,07
Hekzan	1,00 ± 0,26	1,00 ± 0,17	1,00 ± 0,19	1,01 ± 0,07
Metanol-asit	26,49 ± 0,60	32,34 ± 1,18	27,09 ± 0,88	30,92 ± 0,42
Su-asit	76,30 ± 0,96	77,02 ± 0,54	62,96 ± 0,77	78,00 ± 0,46
Butanol-asit	47,09 ± 0,73	55,81 ± 0,93	45,41 ± 1,19	67,99 ± 0,65
Asetonitril-asit	76,51 ± 0,91	77,33 ± 0,76	63,52 ± 0,63	79,65 ± 0,70
Etil asetat-asit	87,33 ± 0,91	86,07 ± 0,86	70,56 ± 0,57	83,95 ± 0,39
Hekzan-asit	1,24 ± 0,07	1,26 ± 0,09	1,59 ± 0,08	1,41 ± 0,37

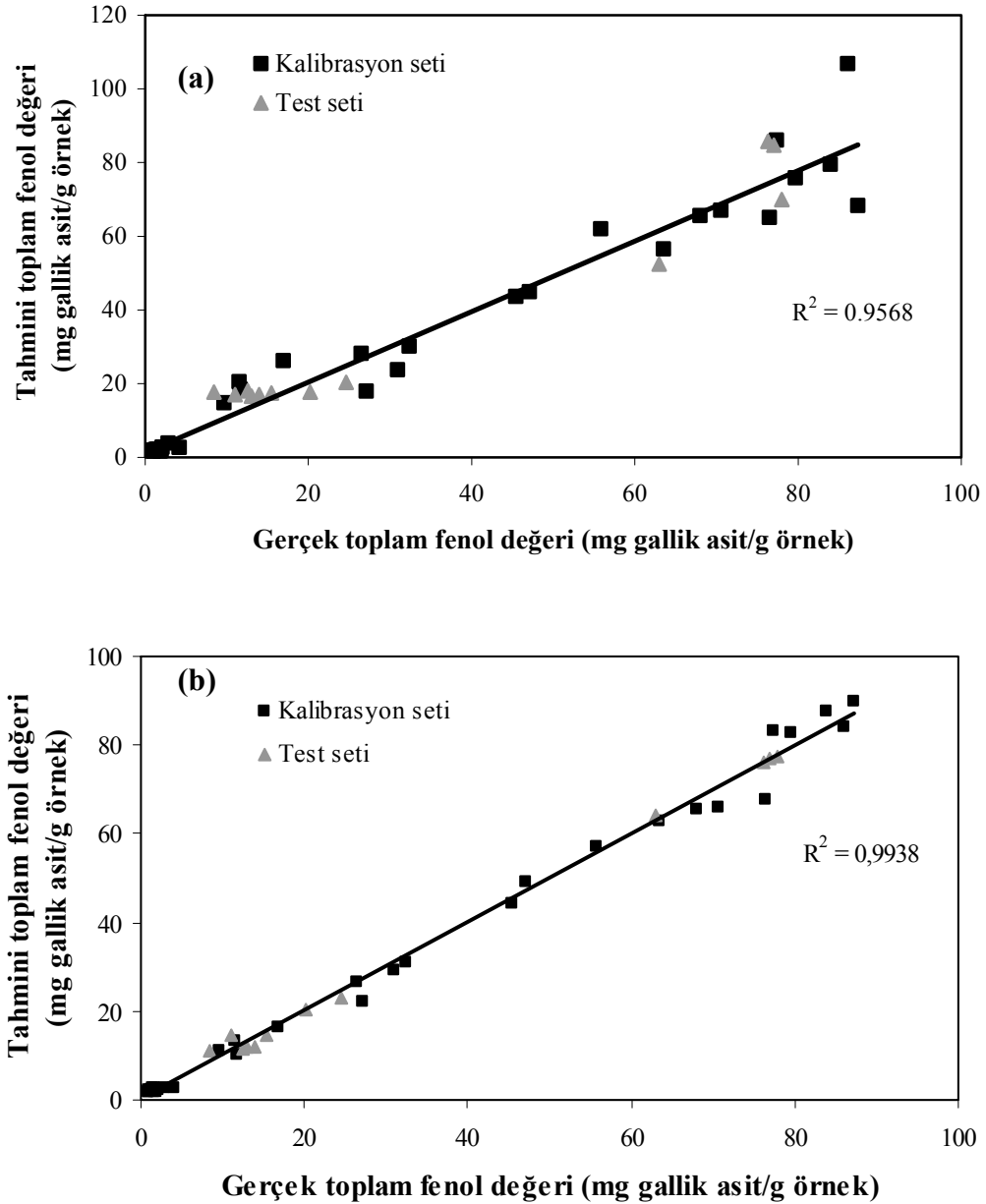
**Çizelge 4.3.1.2.** Kemometrik yöntemlerle bulunan toplam fenol tayinleri için hata değerleri

Model	Ön işlem	Optimum bileşen sayısı	% Hata	
			Kalibrasyon seti	Test seti
PCR	Merkezileştirme	6	6,54	6,62
	Sinyal düzeltme, normalizasyon ve merkezileştirme	6	6,63	4,11
PLS	Merkezileştirme	6	2,47	1,61
	Sinyal düzeltme, normalizasyon ve merkezileştirme	6	4,83	2,76

Çizelge 4.3.1.2'deki hata değerleri göz önüne alındığında en az hata değerlerinin merkezileştirilmiş veriler için bulunduğu görülmektedir. Buna göre hem PLS hem de PCR için kalibrasyon ve test setler için bulunan tahmini değerler ile gerçek değerler grafiğe geçirildiğinde regresyon katsayılarının 1'e yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.3.1.1).

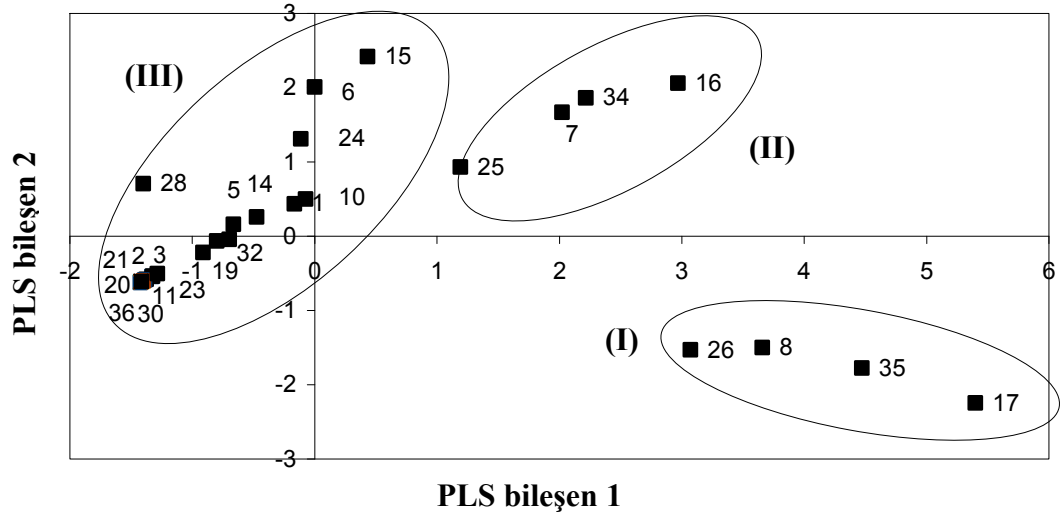
Kemometrik hesaplamalarda skor değerleri kullanılarak toplam fenol miktarları açısından hangi ekstraktların benzer özellik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3.1.2).

Şekil 4.3.1.2’de her bir ekstrakt bir sayı değeri ile ifade edilmektedir. Ayrıca loading değerleri kullanılarak da fenolik maddelerden toplam fenol değerine katkısı olanlar belirlenmiştir (Şekil 4.3.1.3). Bu hesaplamalar için hata hesabının en az olduğu merkezileştirilmiş veri için PLS hesaplamaları sonucu bulunan skor ve loading değerleri kullanılmıştır. Toplam fenole katkısı olan fenolik maddeler loading grafiklerindeki alıkonma zamanlarına göre bulunmuştur.

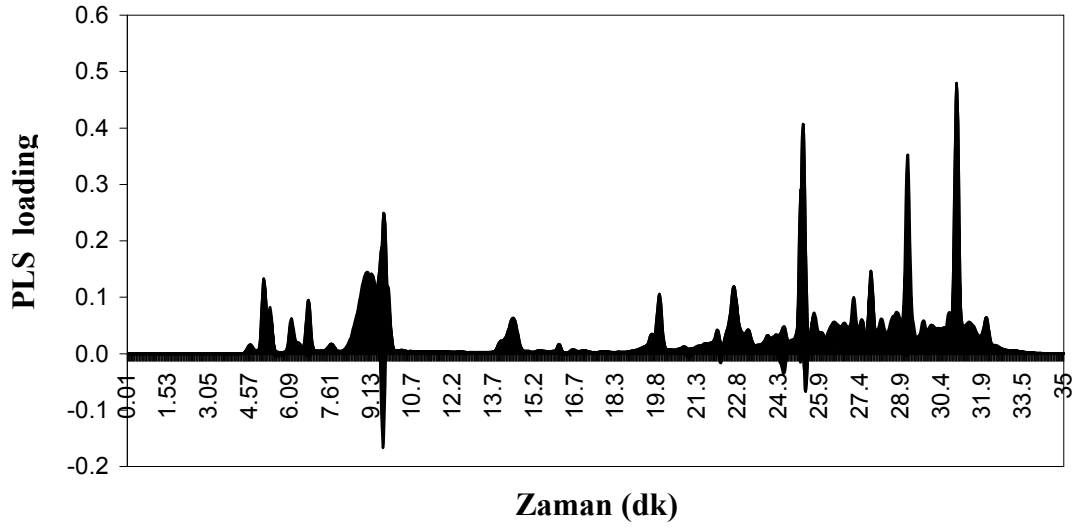


Şekil 4.3.1.1. Merkezileştirilmiş veri için toplam fenol değerleri; a) PCR ile bulunan değerler b) PLS ile bulunan değerler





Şekil 4.3.1.2. Merkezileştirilmiş veri ile bulunan PLS skor grafiği



Şekil 4.3.1.3. Merkezileştirilmiş veri ile bulunan PLS loading grafiği

### 4.3.2. Toplam antioksidan aktivite tayinleri

*Prunella L.* türlerinin kemometrik yöntemler kullanılarak toplam antioksidan aktivite tayinleri yapılmıştır. Burada ham kromatogramlar, COW, sinyal düzeltme, merkezileştirme, normalizasyon teknikleri ile analize hazırlanmıştır. Ön işlem gören kromatogramlara çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden PLS ve OSC-PLS uygulanmıştır. PLS algoritmasında önemli bir faktör olan optimum bileşen sayısı çapraz validasyon (cross-validation) yöntemiyle belirlenmiştir. Kalibrasyon seti için optimum bileşen sayısı 6 olarak belirlenmiştir. PLS ve OSC-PLS hesaplamaları ile *Prunella L.* ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite değerleri bulunmuştur. Bu tahmini toplam antioksidan aktivite değerleri ABTS ve DPPH yöntemi ile bulunan gerçek toplam antioksidan aktivite değerleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre toplam antioksidan aktivite değerleri için % hata değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.3.2.1). Kemometrik hesaplamalarda kullanılan gerçek değerler (ABTS ve DPPH yöntemi ile bulunan toplam antioksidan aktivite değerleri) 2009 yılında toplanan bitki örneklerinin toplam antioksidan aktivite değerleridir.

**Çizelge 4.3.2.1.** Kemometrik yöntemlerle bulunan toplam antioksidan aktivite tayinleri için hata değerleri

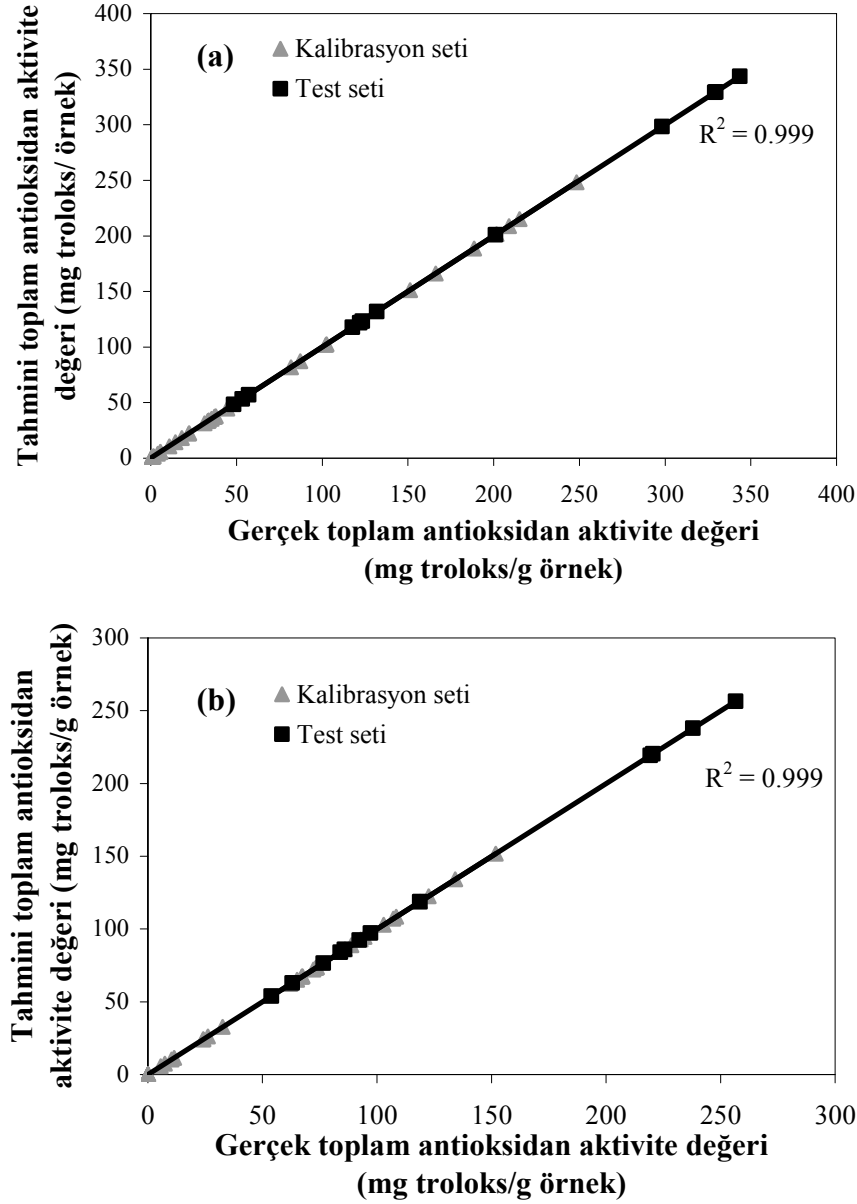
	ABTS (% Hata)			
	PLS		OSC-PLS	
	Kalibrasyon seti	Test seti	Kalibrasyon seti	Test seti
Merkezileştirme	23,41	17,68	0,02	0,01
Sinyal düzeltme, normalizasyon ve merkezileştirme	18,81	17,68	0,07	0,10

	DPPH (% Hata)			
	PLS		OSC-PLS	
	Kalibrasyon seti	Test seti	Kalibrasyon seti	Test seti
Merkezileştirme	12,96	13,75	0,01	0,01
Sinyal düzeltme, normalizasyon ve merkezileştirme	10,24	11,23	0,10	0,10

Çizelge 4.3.2.1'deki hata değerleri göz önüne alındığında en az hata değerlerinin merkezileştirilmiş veriler için bulunduğu görülmektedir. Buna göre hem PLS hem de

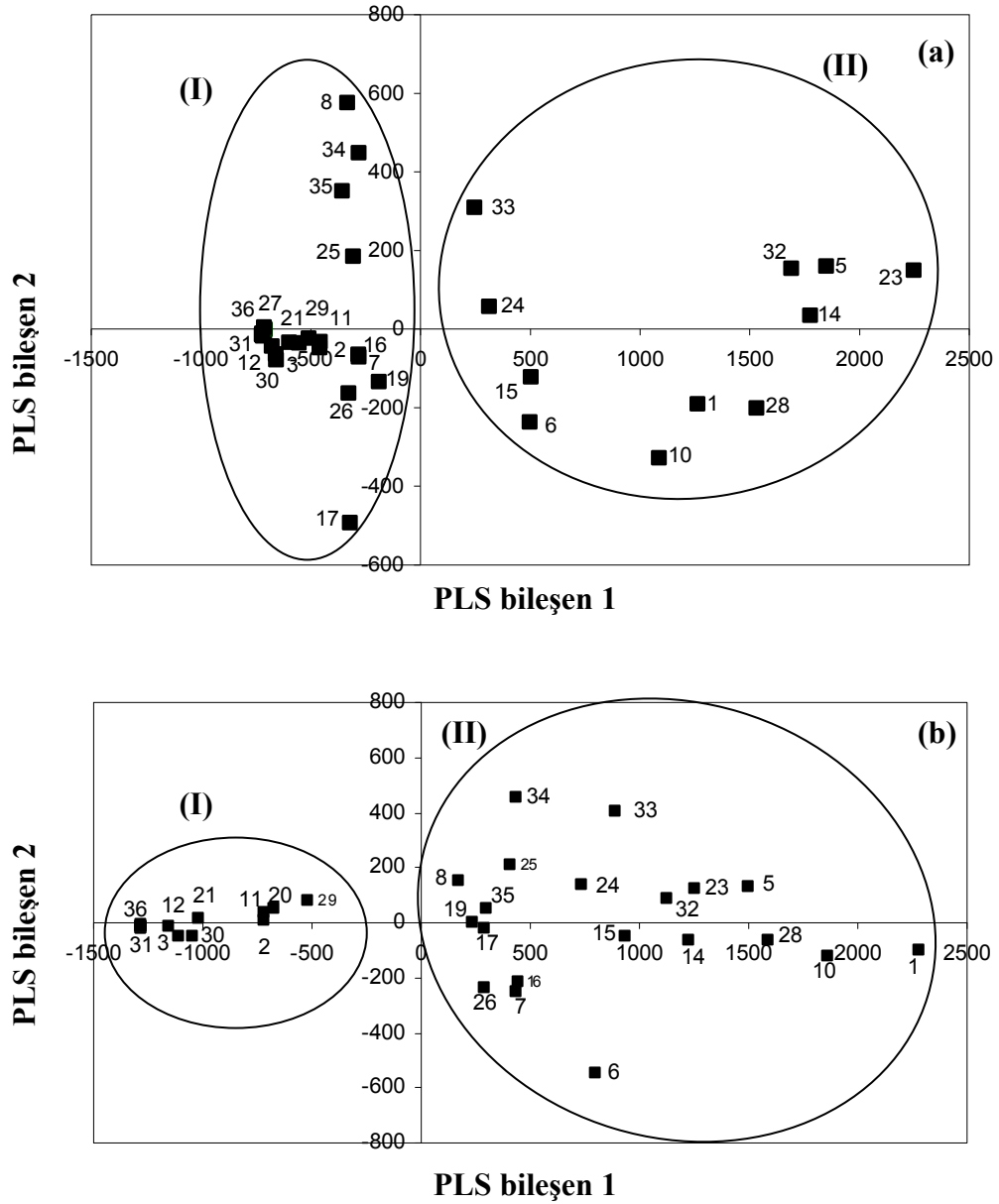
OSC-PLS için kalibrasyon ve test setler için bulunan tahmini değerler ile gerçek değerler grafiğe geçirildiğinde regresyon katsayılarının 1'e yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.3.2.1).



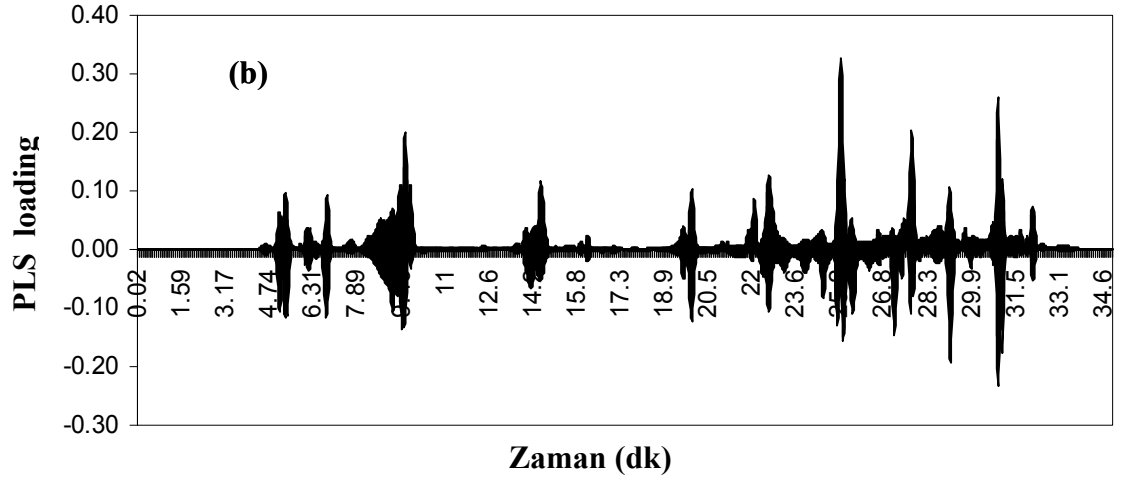
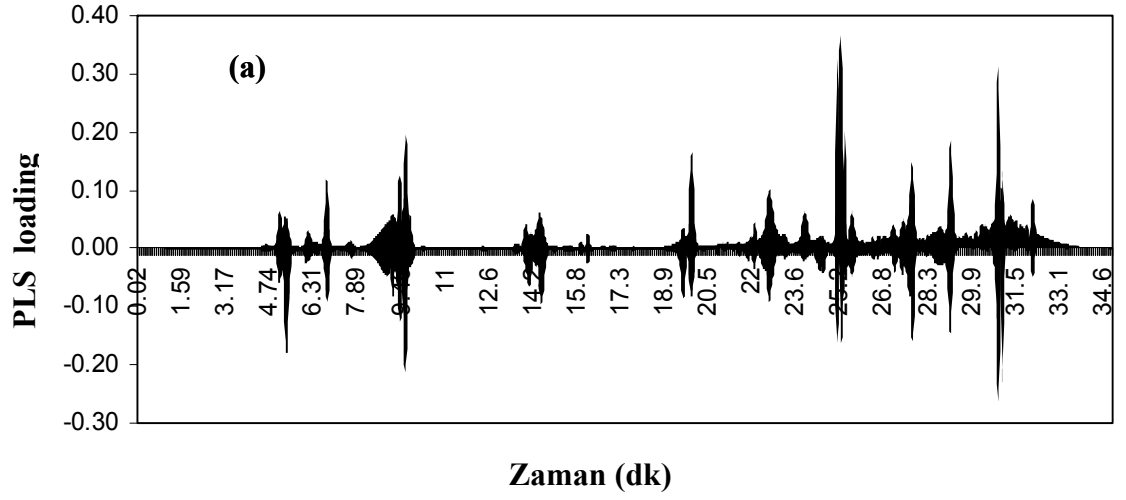
**Şekil 4.3.2.1.** Merkezileştirilmiş veri için toplam antioksidan aktivite değerleri; **a)** ABTS yöntemi için OSC-PLS ile bulunan değerler **b)** DPPH yöntemi için OSC-PLS ile bulunan değerler

Kemometrik hesaplamalarda skor değerleri kullanılarak toplam antioksidan aktivite miktarları açısından hangi ekstraktların benzer özellik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3.2.2). Şekil 4.3.2.2'de her bir ekstrakt bir sayı değeri ile ifade edilmiştir. Ayrıca

loading değerleri kullanılarak da fenolik maddelerden toplam antioksidan aktivite değerine katkısı olanlar belirlenmiştir (Şekil 4.3.2.3). Bu hesaplamalar için hata hesabının en az olduğu merkezileştirilmiş veri için OSC-PLS hesaplamaları sonucu bulunan skor ve loading değerleri kullanılmıştır. Toplam antioksidan aktiviteye katkısı olan fenolik maddeler loading grafiklerindeki alıkonna zamanlarına göre bulunmuştur.



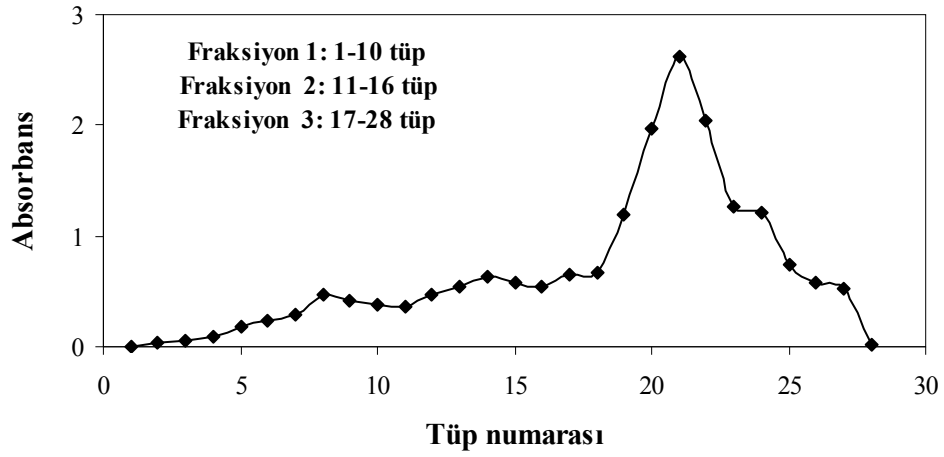
Şekil 4.3.2.2. Merkezileştirilmiş veri ile bulunan OSC-PLS skor grafiği a) ABTS yöntemi, b) DPPH yöntemi



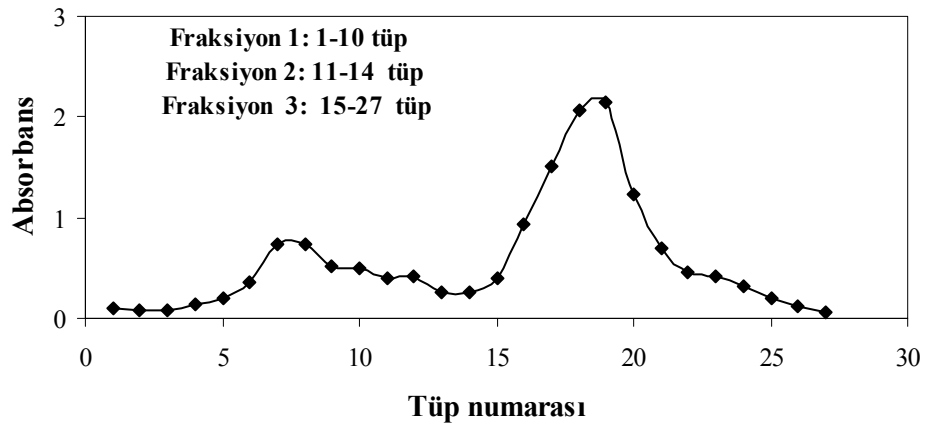
**Şekil 4.3.2.3.** Merkezileştirilmiş veri ile bulunan OSC-PLS loading grafiği a) ABTS yöntemi, b) DPPH yöntemi

#### 4.4. İzolasyon çalışmaları

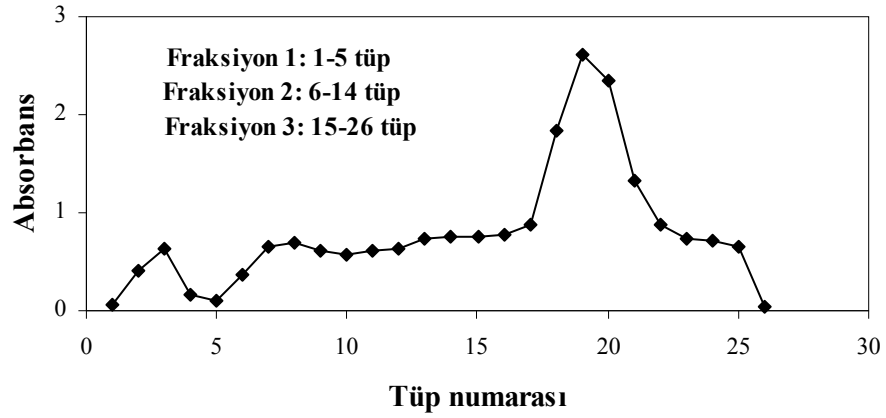
*Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella vulgaris* L., *Prunella orientalis* Bornm, *Prunella grandiflora* L. türlerinin metanol ekstraktları Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ile izole edilmiştir. *Prunella* L. türlerinin elde edilen metanol fraksiyonlarının (4 mL/tüp) 280 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.4.1-4.4.4). Daha sonra tüp numaralarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kaç tane madde izole edildiğine karar verilmiştir. Tüplerdeki fraksiyonlar birleştirilerek izole edilen fenolik madde gruplarının ayrılması sağlanmıştır.



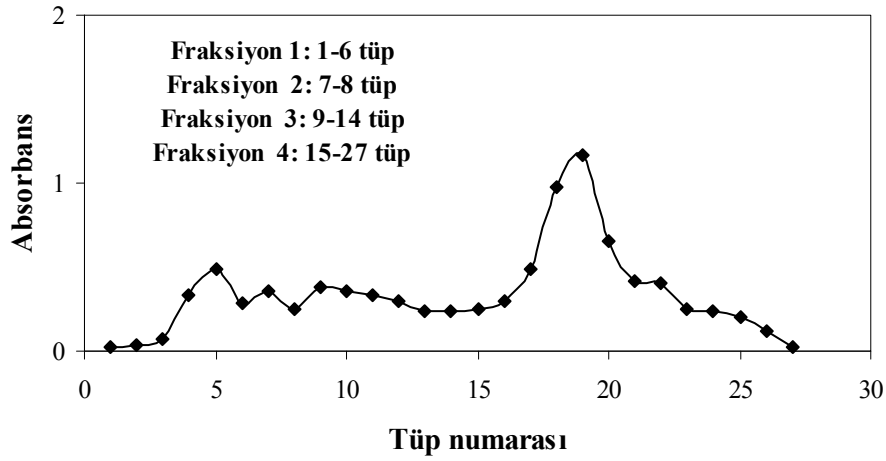
Şekil 4.4.1. *Prunella vulgaris* L. metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların absorbans grafiği



Şekil 4.4.2. *Prunella laciniata* (L.) L. metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların absorbans grafiği



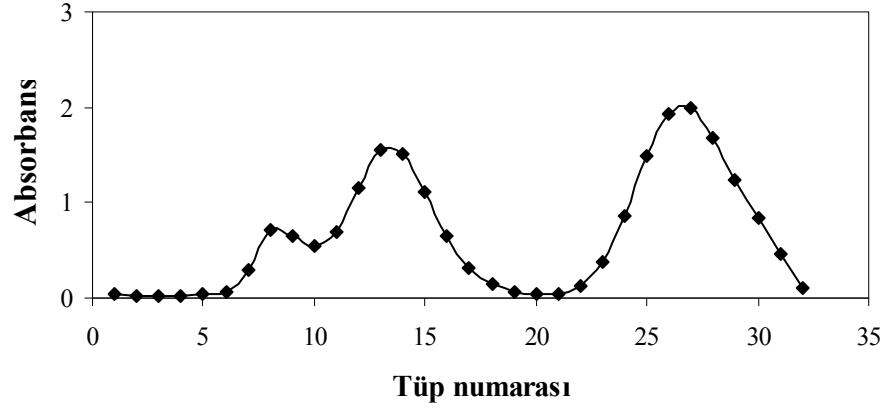
**Şekil 4.4.3.** *Prunella grandiflora* L. metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların absorbens grafiği



**Şekil 4.4.4.** *Prunella orientalis* Bornm. metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların absorbens grafiği

Elde edilen fraksiyonların ve ekstraktların HPLC-DAD cihazı ile kromatografik analizleri, Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenol ve ABTS yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayinleri yapılmıştır. HPLC-DAD analizlerine göre *Prunella* L. türlerinden rosmarinik asit, rutin ve kafeik asit izole edildiği belirlenmiştir. Buna göre içerisinde standart rosmarinik asit, rutin ve kafeik asit bulunan metanol karışımı da Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ile izole edilmiştir. Elde edilen metanol fraksiyonlarının (4 mL/tüp) 280 nm'de absorbens ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.4.5). Çizelge 4.4.1'de fraksiyonlarda ve ekstraktlarda bulunan fenolik madde miktarları,

Çizelge 4.4.2’de fraksiyonların ve ekstraktların toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değerleri verilmektedir.



Şekil 4.4.5. Standart fenolik maddelerden (rosmarinik asit, rutin ve kafeik asit) elde edilen fraksiyonların absorbans grafiği

Çizelge 4.4.1. Fraksiyonlarda ve ekstraktlarda bulunan fenolik madde miktarları

Bitki	Örnek	Rutin (mg/g örnek)	Rosmarinik asit (mg/g örnek)	Kafeik asit (mg/g örnek)	Toplam (mg/g örnek)
<i>Prunella vulgaris</i> L.	Ekstrakt	1,120 ± 0,240	13,900 ± 1,760	0,060 ± 0,010	15,080 ± 2,010
	Fraksiyon 1	x	x	x	14,480 ± 0,070
	Fraksiyon 2	0,630 ± 0,010	0,310 ± 0,010	0,070 ± 0,010	
	Fraksiyon 3	0,210 ± 0,010	13,260 ± 0,030	x	
<i>Prunella laciniata</i> (L.) L.	Ekstrakt	0,76 ± 0,010	14,98 ± 0,110	0,060 ± 0,010	15,800 ± 0,130
	Fraksiyon 1	0,010 ± 0,001	0,020 ± 0,001	x	11,970 ± 0,242
	Fraksiyon 2	0,420 ± 0,010	0,060 ± 0,010	0,060 ± 0,010	
	Fraksiyon 3	0,280 ± 0,010	11,120 ± 0,200	x	
<i>Prunella grandiflora</i> L.	Ekstrakt	5,880 ± 0,100	20,590 ± 1,490	0,170 ± 0,010	26,640 ± 1,600
	Fraksiyon 1	x	0,160 ± 0,010	x	19,660 ± 0,240
	Fraksiyon 2	1,770 ± 0,010	0,480 ± 0,010	0,080 ± 0,010	
	Fraksiyon 3	2,290 ± 0,010	14,880 ± 0,190	x	
<i>Prunella orientalis</i> Bornm.	Ekstrakt	0,410 ± 0,020	7,040 ± 0,250	0,050 ± 0,010	7,500 ± 0,280
	Fraksiyon 1	x	x	x	7,460 ± 0,070
	Fraksiyon 2	0,020 ± 0,010	x	x	
	Fraksiyon 3	0,290 ± 0,010	0,350 ± 0,010	0,060 ± 0,010	
	Fraksiyon 4	x	6,740 ± 0,030	x	



**Çizelge 4.4.2.** Fraksiyonların ve ekstraktların toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değerleri

Bitki türü	Örnek	Toplam fenol (mg gallik asit/g örnek)	Toplam antioksidan aktivite (mg troloks/g örnek)
<i>Prunella vulgaris</i> L.	Ekstrakt	97,0±2,4	46,2±2,6
	Fraksiyon 1	4,5±0,1	2,5±0,1
	Fraksiyon 2	11,2±1,4	3,7±0,1
	Fraksiyon 3	65,1±3,6	36,7±2,0
<i>Prunella laciniata</i> (L.) L.	Ekstrakt	93,4±3,1	55,4±1,5
	Fraksiyon 1	6,8±0,1	3,9±0,1
	Fraksiyon 2	6,2±0,4	3,1±0,1
	Fraksiyon 3	74,3±1,2	36,4±1,9
<i>Prunella grandiflora</i> L.	Ekstrakt	184,0±3,5	83,4±0,6
	Fraksiyon 1	10,7±0,8	4,6±0,2
	Fraksiyon 2	18,9±1,2	17,0±1,2
	Fraksiyon 3	92,4±0,1	44,9±0,4
<i>Prunella orientalis</i> Bornm.	Ekstrakt	56,1±1,9	33,6±0,1
	Fraksiyon 1	7,0±0,2	1,8±0,1
	Fraksiyon 2	1,0±0,1	0,4±0,1
	Fraksiyon 3	5,1±0,1	2,0±0,1
	Fraksiyon 4	41,9±0,6	20,0±1,1

İzolasyon çalışmalarında Folin yönteminde kullanılan kalibrasyon grafiği  $y = 0,0158 x + 0,0334$ , regresyon katsayısı 0,999, ABTS yönteminde kullanılan kalibrasyon grafiği  $y = 2459,9 x + 2,234$ , regresyon katsayısı 0,997'dir.

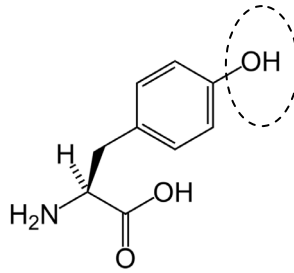
## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada sunulan bulguların tartışma ve sonuç bölümü dört ana başlıkta toplanabilir. Bunlar;

- Spektroskopik yöntemler,
- Kromatografik yöntemler,
- Kemometrik yöntemler,
- İzolasyon çalışmalarıdır.

### 5.1. Spektroskopik Yöntemler

Yaklaşık 100 yıldır toplam fenol ölçümleri için kullanılan Folin yöntemi, Folin ve arkadaşları tarafından insan vücudundaki protein metabolizması çalışmaları sırasında geliştirilmiştir. Folin ve Denis (1912) protein hidrokzilatlarında bulunan tyrosin aminoasidinin tayini için bir kolorimetrik yöntem önermişlerdi. Bu yöntem, fosfotungstik ( $WO_4^{2-}$ ) ve fosfomolibdik ( $MoO_4^{2-}$ ) reaktif karışımının tyrosinin fenolik hidroksil grubu (Şekil 5.1.1) tarafından indirgenmesi ve sonuçta mavi renkli ürün oluşmasına dayanmaktadır.



Şekil 5.1.1. Tyrosin fenolik hidroksil grubu

1927 yılında bu yöntem Folin ve Ciocalteu (1927) tarafından yeniden geliştirilmiştir. Günümüzde Folin-Ciocalteu reaktifi, protein hidrokzilatlarında bulunan tyrosinin ve triptofanın miktar tayinlerinde kullanıldığı gibi pek çok materyalde bulunan fenolik maddelerin tayinlerinde de çok geniş kullanım alanına sahip olmuştur. Folin ve

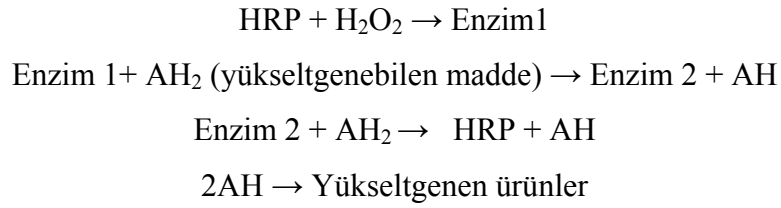
Ciocalteu tarafından geliştirilen bu yöntem çözünebilen fenolik bileşiklerin (Antosiyaninler, tanenler vb.) tayinlerinde kullanılır. Swain and Hillis (1959), fenolik madde bileşimlerinin Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenmesi üzerinde oldukça etkili olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca, Folin-Ciocalteu yöntemi ile farklı orijine sahip örneklerin karşılaştırılmasının uygun olmadığını belirtmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda Folin-Ciocalteu yönteminin örneklerin indirgeme kapasitelerinin ölçümlerinde etkili olduğu da belirtilmiştir. Bu yöntemin sahip olduğu avantajları yanında fenolik olmayan organik maddelerle (şekerler, aromatik aminler, askorbik asit, adenin, adenozin, aminobenzoik asit, EDTA, fruktoz, guanin, indol, proteinler vb.) ve bazı inorganik maddelerle (hidrazin, demir amonyum sülfat, magnezyum sülfat, potasyum nitrat, sodyum sülfat, sodyum nitrat vb.) reaksiyon verebildiği için dezavantaja da sahiptir (Prior ve Schaich, 2005). Toplam fenol içerikleri spesifik olmayan redoks reaksiyonları temeline dayanılarak tayin edilmelidir. Çünkü örnekte bulunan diğer fenolik olmayan indirgenmiş moleküllerin de bu tayin yönteminde istenmeyen etkisi nedeniyle toplam fenol miktarında sapmalar olabilmektedir. Bu yöntem zaman alıcı ve fazla kimyasal madde kullanımı gerektiren bir yöntemdir. Bu nedenle bitki ekstraktlarında toplam fenol tayini ölçümlerinde Folin-Ciocalteu yöntemi yanında daha spesifik enzimatik toplam fenol tayini yöntemleri de kullanılabilir (Stevanato ve ark. 2004).

Bu çalışmada *Prunella L.* cinsinin; *Prunella vulgaris L.*, *Prunella laciniata (L.) L.*, *Prunella orientalis* Bornm., ve *Prunella grandiflora L.* olmak üzere 4 türünün farklı polaritedeki çözücü ekstraktlarının geliştirilen alternatif enzimatik toplam fenol sonuçları Folin-Ciocalteu ile karşılaştırılmıştır. Kullanılan enzim hem serbest hem de polimerik destek maddesi üzerine immobilize edilerek toplam fenol tayinleri yapılmıştır. Immobilize edilmiş enzim çok sayıda ölçüm yapmaya imkan sağladığı için enzim kullanma maliyeti de düşürülmüştür. Ayrıca ölçümlerin daha kısa sürede ve daha az kimyasal madde kullanılarak yapılması sağlanmıştır. Bu amaçla enzimin kullanılabilirlik ve aktivite çalışmaları da yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda asit kullanılarak yapılan çözücü ekstraktlarının toplam fenol değerleri asitsiz yapılan çözücü ekstraktlarının toplam fenol değerlerinden yüksek bulunmuştur. Bu da bitkinin yapısında bulunan flavonoid glikozitlerinin asidik hidroliz ile serbest hale geçtiği ve

toplam fenol değerlerinin hep serbest halde bulunan hem de glikozitlerin hidrolizinden gelen fenolik maddelerden kaynaklandığı sonucunu ortaya çıkarmıştır.

### 5.1.1. Enzimatik reaksiyonlar

Horseradish peroksidaz (HRP) enzimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında çok sayıda aromatik bileşigi yükseltgeyen bir hemoproteindir.



HRP enzimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından yükseltgenir (Enzim 1). Daha sonra enzimin aktif bölgesine bağlanan fenolik maddenin yükseltgenmesi ile enzim indirgenmiş haline geri döner. Bu şekilde fenolik maddelerin enzimatik yükseltgenmesi gerçekleşir. Daha sonra oluşan ürünlerin 4-aminoantipirin yapısındaki aromatik amin grubuna saldırması sonucu kuinon-imin renkli ürünü elde edilir (Şahin ve ark. 2011a).

### 5.1.2. İmmobilizasyon zamanının optimizasyonu

İmmobilizasyon zamanı enzim-destek maddesi arasındaki reaksiyona göre değişim gösterebilir. Önemli olan enzim ile destek maddesi arasında çok fazla noktadan kovalent etkileşim olmasıdır. Bu amaçla HRP enziminin optimum immobilizasyon süresini belirleyebilmek için 48 saat süreyle polimer üzerinden enzim geçirilir. Belirli süreler sonundan enzim çözeltisinden örnek alınarak Bradford yöntemine göre protein tayini yapılır (Şekil 4.1.2.1). Tüm örneklerdeki protein miktarları hesaplanarak g polimer başına tutunan mg enzim miktarı hesaplanır (Şekil 4.1.2.2). Buna göre 26 saat sonunda enzimin başlangıç miktarına göre %82'si destek maddesi üzerinde tutunduğu bulunmuştur. Enzim immobilizasyonu için yapılan çalışmalarda optimum süre 26 saat seçilmiştir (Şahin ve ark. 2011a). STR-DVB-PGA polimerine 26 saat sonunda kovalent

bağlanan HRP enziminin aktivitesi serbest enzime göre %90'dır. Sinamik asit karbohidrat esterleri gibi farklı destek maddeleri kullanıldığında da immobilizasyon süresinin 21-24 saat değiştiği görülmektedir (Rojas-Melgarejo ve ark. 2004, Vojinović ve ark. 2004). Farklı destek maddeleri için benzer immobilizasyon verimleri ve STR-DVB-PGA destek maddesinin kararlılığı göz önünde bulundurulduğunda immobilizasyon süresince HRP enziminin aktivitesinin kaybolmadığı sonucuna varılmaktadır (Şahin ve ark. 2011a).

### **5.1.3. Fenolik madde/4-aminoantipirin oranının etkisi**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında enzim tarafından yükseltgenen fenolik maddeler, 4-aminoantipirin yapısındaki aromatik amin grubuna saldırması sonucu kuinon-imin renkli ürünü elde edilir. Oluşan bu renkli ürünün miktarı örnekteki fenolik madde ve 4-aminoantipirin miktarına göre değişebilir. Bu amaçla hem Folin hem de enzimatik yöntemde kullanılan standart madde gallik asit seçilerek gallik asit/4-aminoantipirin oranının etkisi incelenmiştir. Kuinon imin renkli ürün miktarının gallik asit/ 4 aminoantipirin molarite oranına göre değişimi Şekil 4.1.2.3'te verilmiştir.

Buna göre en yüksek 1:2 oranında toplam fenol miktarı elde edilmiştir. En düşük oranın 1:20 olmasına rağmen 1:3 oranında en düşük toplam fenol miktarı bulunmuştur. Buna göre oluşan renkli ürün miktarının gallik asit/ 4 aminoantipirin molarite oranına göre doğrusal değişmediğini sonucuna varılmıştır. Yapılan enzimatik toplam fenol ölçümlerinde optimum gallik asit/ 4 aminoantipirin molarite oranı 1:2 seçilmiştir (Şahin ve ark. 2011a).

### **5.1.4. İmmobilize HRP enziminin optimum kullanım sayısı**

Kullanım sayısının % toplam fenol değerine göre değişimi Şekil 4.1.2.4'te verilmiştir. Buna göre bir kolonun 10 defa kullanım sonunda toplam fenol değerlerinde % 23 azalma olduğu görülmektedir. Literatürde etanol, metanol, aseton ve asetonitril ortamında HRP aktivitesi ölçüldüğünde, enzim aktivitesinin metanol ve asetonitril ortamında %10 oranında azaldığı bulunmuştur (Temoçin ve Yiğitoğlu 2009). Yapılan

çalışmalarda kullanılan bitki ekstraktının miktarı 0,1 mL olduğu için organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisinin ihmal edilebilecek kadar az olduğu sonucuna varılmıştır (şahin ve ark. 2011a)

#### **5.1.5. İmmobilize HRP enziminin optimum depolanma süresi**

Buzdolabında (4°C'de) 30 gün süre ile bekletilen immobilize enzimin optimum depolanma süresini belirlemek amacıyla farklı zaman aralıklarında bitki ekstraktı kullanılarak enzimatik toplam fenol ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümlerde 30 gün sonunda toplam fenol değerinde başlangıca göre %47 azalma görülmüştür (şekil 4.1.2.5). Buna göre enzim ortam şartlarına göre belli süre sonunda inaktive olmaktadır (şahin ve ark. 2011a).

#### **5.1.6. Serbest ve immobilize HRP enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin incelenmesi**

Serbest enzim için  $K_m$  değeri 3,16 mM,  $V_{max}$  değeri 0,37 mmol ABTS/mg enzim.dk (şekil 4.1.2.6), STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilmiş HRP enzimi için  $K_m$  değeri 3,74 mM,  $V_{max}$  değeri 0,19 mmol ABTS/mg enzim.dk (şekil 4.1.2.7) olarak belirlenmiştir. Kinetik sabitlerde gözlenen  $K_m$  ve  $K_m/V_{max}$  oranının değerindeki artışlar, immobilize HRP enzimi için gözlenen %10 aktivite kaybını da açıklamaktadır (şahin ve ark. 2011a).

#### **5.1.7. *Prunella L.* türlerinin toplam fenol miktarları**

*Prunella L.* türlerinin su, metanol, butanol, asetonitril, etil asetat, hekzan ve bunların asidik ekstraktlarının toplam fenol miktarları enzimatik yöntemle tayin edilmiştir. Bulunan sonuçlar Folin yöntemiyle karşılaştırılmıştır (şekil 4.1.3.1-4.1.3.4). Folin yöntemi ile yapılan toplam fenol tayinlerine askorbik asitin katkısını belirlemek için kör örnekler hazırlandı. Asitli çözücüler için bu katkı değeri 4 mg gallik asit/örnek, asitsiz çözücüler için 1 mg gallik asit/g örnek belirlenmiş ve bulunan toplam fenol değerlerinden bu değerler çıkarılmıştır. Folin yöntemine göre *Prunella L.* türleri için ekstraksiyon işlemlerinde kullanılması en uygun olan çözücü metanol-asittir. Genel

olarak da literatüre bakıldığında asidik hidrolizin flavonoid ekstraksiyonları için çok uygun olduğu belirtilmektedir. *Prunella L.* türleri için asidik hidroliz ile yapılan çözücü ekstraktlarının toplam fenol değerleri hidroliz edilmeden elde edilen çözücü ekstraktların toplam fenol değerlerinden yüksek bulunmuştur. Bu da bitkinin yapısında bulunan flavonoid glikozitlerinin asidik hidroliz ile serbest hale geçtiği ve toplam fenol değerlerinin hem serbest halde bulunan hem de glikozitlerin hidrolizinden gelen fenolik maddelerden kaynaklandığı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Folin yöntemiyle bulunan toplam fenol değerleri çözücü ekstraksiyonları için 0,1-147 mg, asidik hidroliz için 0,2-258 mg gallik asit/g örnek olarak değişim göstermektedir. *Prunella vulgaris* türünün metanol ekstraktı en fazla toplam değerine sahip iken *Prunella orientalis* türünün hekzan ekstraktı en az toplam fenol içermektedir. Asidik hidrolizlere bakıldığında en fazla toplam fenol içeriği *Prunella laciniata* türünün metanol-asit ekstraktı sahip iken aynı türün hekzan-asit ekstraktı da en az toplam fenol içeriğine sahiptir. *Prunella L.* türleri için Folin yöntemiyle bulunan tüm toplam fenol içerikleri karşılaştırıldığında çözücü etkisi şu sırayla bulunmuştur: metanol-asit> su-asit> butanol-asit> metanol> asetonitril-asit> su> etil asetat-asit> butanol> asetonitril> etil asetat> hekzan-asit> hekzan (Şahin ve ark. 2011a).

Serbest enzim yöntemi ile toplam fenol miktarları çözücü ekstraksiyonları için 14-336 mg, asidik hidroliz için 24-865 mg gallik asit/g örnek olarak değişim göstermektedir. Toplam fenol miktarlarına bakıldığında serbest enzim yöntemi ile bulunan sonuçlar Folin ve immobilize enzim yöntemlerine göre daha yüksek bulunmuştur. *Prunella L.* türlerinin asidik su ekstraktlarının toplam fenol miktarları ise serbest ve immobilize enzim yöntemlerine göre Folin yöntemi ile daha yüksek bulunmuştur. Bu durum asidik su örneklerinde diğer ekstraktlara göre yüksek miktarda antosiyanin bulunmasından kaynaklanır. Bu nedenle su, metanol ve bunların asidik ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarı ölçülmüştür (Çizelge 4.1.4.1). Buna göre en yüksek miktarda toplam antosiyanin su-asit ekstraktları içermektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre enzim antosiyaninler tarafından inhibe edilmekte ve kalan enzim aktivitesi de örnekteki tüm fenolik maddeleri yükseltmek için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle su-asit ekstraktlarının toplam fenol miktarı su ekstraktlarına göre daha az bulunmuştur (Şahin ve ark. 2011a). *Prunella L.* türleri için üç yöntem

karşılaştırıldığında, serbest enzim ve Folin yöntemi arasındaki korelasyon değeri 0,76; immobilize enzim ve Folin yöntemi arasındaki korelasyon değeri 0,70; serbest ve immobilize enzim yöntemi arasındaki korelasyon değeri 0,94 bulunmuştur. Genel olarak g örnek başına mg gallik asit miktarları Folin yöntemine göre enzimatik yöntemler daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak *Prunella L.* türlerinin 12 farklı çözücü ekstraktı için immobilize enzim yöntemi ile toplam fenol miktarları başarılı bir şekilde tayin edilmiştir. Metanol-asit bütün örneklerde, toplam fenol ekstraksiyonu için en uygun çözücü bulunmuştur. Immobilize enzim;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca ayrılır.
- Tamamen ayrıldığından ürünlerde kirlilik oluşturmaz.
- Çevre koşullarına daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Daha dayanıklı ve kararlıdır.
- Çok adımlı reaksiyonlara uygundur.
- Aktivitesini uzun süre korur.

Bu nedenle enzimatik yöntemle toplam fenol tayinleri daha spesifik ve diğer spektroskopik yöntemlere göre daha kesindir.

## 5.2. Kromatografik Yöntemler

### 5.2.1. *Prunella L.* türlerinde tayin edilen fenolik maddeler

Bu çalışmada *Prunella L.* türlerinde (*Prunella vulgaris L.*, *Prunella laciniata (L.) L.*, *Prunella orientalis* Bornm. ve *Prunella grandiflora L.*) bulunan fenolik maddeler HPLC-DAD cihazı ile kantitatif olarak tayin edilmiştir (Şahin ve ark. 2011b). *Prunella L.* türlerinde HPLC-DAD analizleri sonucunda bulunan fenolik maddeler; kuersetin, rutin, rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit ve protokatekuik asittir. *Prunella L.* türlerinde bulunan fenolik maddelerin miktarları Çizelge 4.2.1.1 ve Çizelge 4.2.1.2’de verilmiştir. Çizelge 4.2.1.1’de ekstraksiyon yöntemine göre, 4.2.1.2’de asidik hidroliz yöntemine göre bulunan fenolik madde miktarları bulunmaktadır. Kuersetin,



*Prunella grandiflora* L. su ekstraktı dışında diğer çözücü ekstraktlarında tayin edilmemiştir. Bununla birlikte *Prunella grandiflora* L. su ekstraktında bulunan kuersetin miktarı  $0,36\pm 0,01$  mg/g örnek bulunmuştur. Asidik hidroliz yöntemine göre, kuersetin tayin edilebilen tek flavonoldür. Kuersetin *Prunella vulgaris* L. örneklerinde  $0,19\pm 0,01$ – $2,10\pm 0,26$  mg/g örnek, *Prunella laciniata* (L.) L. örneklerinde  $0,72\pm 0,01$ – $4,31\pm 0,02$  mg/g örnek, *Prunella grandiflora* L. örneklerinde  $1,09\pm 0,06$ – $6,41\pm 0,11$  mg/g örnek ve *Prunella orientalis* Bornm. örneklerinde  $0,31\pm 0,01$ – $1,74\pm 0,02$  mg/g örnek bulunmuştur. En yüksek kuersetin miktarı *Prunella grandiflora* L. nin etil asetat-asit ekstraktında bulunmuştur. Çizelge 4.2.1.1–4.2.1.2’den görüldüğü gibi kuersetin miktarları asidik hidroliz sonrası artmaktadır. Çünkü, kuersetin glikoziti olan rutin, kuvvetli asidik ortam hidroliz olarak aglikonu olan kuersetine dönüşmektedir. Bu nedenle kuersetin miktarları asidik hidroliz sonrası artmaktadır (Şahin ve ark. 2011b).

Asidik hidroliz yöntemine göre bulunan rutin miktarları da ekstraksiyon yöntemine göre bulunan miktarlardan yüksek bulunmuştur. Rutin, *Prunella vulgaris* L. örneklerinde  $1,45\pm 0,06$ – $4,01\pm 0,05$  mg/g örnek, *Prunella laciniata* (L.) L. örneklerinde  $0,27\pm 0,01$ – $3,12\pm 0,02$  mg/g örnek, *Prunella grandiflora* L. örneklerinde  $3,93\pm 0,01$ – $7,13\pm 0,02$  mg/g örnek ve *Prunella orientalis* Bornm. örneklerinde  $0,93\pm 0,08$ – $6,52\pm 0,06$  mg/g örnek bulunmuştur. Buna göre en yüksek rutin miktarı *Prunella grandiflora* L. butanol-asit ekstraktında bulunmuştur. Aynı zamanda literatüre bakıldığında *Prunella vulgaris* L. türünde bulunan rutin miktarı Cheung ve Zhang (2008) yaptığı çalışmaya göre daha yüksek bulunmuştur.

Kafeik asit, ferulik asit, klorojenik asit ve protokatekuik asit *Prunella* L. örneklerinde az miktarlarda bulunmuştur. Kafeik asit *Prunella grandiflora* L. dışında *Prunella* L. türlerinde sadece su, su-asit, asetonitril-asit ve etil asetat-asit ekstraktlarında bulunmuştur. *Prunella grandiflora* L. için metanol ekstraktında kafeik asit bulunmuştur. *Prunella* L. türlerinde kafeik asit miktarı  $0,11\pm 0,01$ – $1,82\pm 0,05$  mg/g örnektir. En yüksek kafeik asit miktarı *Prunella grandiflora* L. su-asit ekstraktında bulunmuştur. Klorojenik asit ise *Prunella* L. türlerinin su ekstraktlarında tayin edilirken *Prunella grandiflora* L. su ekstraktında tayin edilememiştir. Butanol-asit, etil asetat-asit, su-asit

örneklerinde bulunan klorojenik asit miktarı  $0,19\pm0,09$ - $1,07\pm0,03$  mg/g örnektir. Klorojenik asit en fazla *Prunella grandiflora* L. butanol-asit ekstraktında bulunmuştur. Bununla birlikte literatüre bakıldığında *Prunella* L. türlerinde ferulik and protokatekuik asit tayin edilmemiştir. Yaptığımız çalışmada ise ferulik asit en fazla *Prunella orientalis* Bornm. asetonitril-asit ekstraktında, protokatekuik asit ise en fazla *Prunella grandiflora* L. su ekstraktında bulunmuştur. Ayrıca literatüre göre *Prunella* L. türlerinde tayin edilen *p*-kumarik asit (Wang ve ark. 2000) çalışmamızdaki hiçbir *Prunella* L. ekstraktında tayin edilememiştir (Şahin ve ark. 2011b).

*Prunella* L. türlerinde bulunan başlıca fenolik madde rosmarinik asittir. Rosmarinik asit, *Prunella vulgaris* L. örneklerinde  $1,19\pm0,01$ - $38,28\pm0,68$  mg/g örnek, *Prunella laciniata* (L.) L. örneklerinde  $0,84\pm0,01$ - $39,19\pm0,48$  mg/g örnek, *Prunella grandiflora* L. örneklerinde  $0,70\pm0,01$ - $36,45\pm0,04$  mg/g örnek ve *Prunella orientalis* Bornm. örneklerinde  $0,24\pm0,01$ - $18,95\pm0,14$  mg/g örnek bulunmuştur. *Prunella laciniata* (L.) L. asetonitril-asit örneğinde bulunan rosmarinik asit en yüksektir. Aynı zamanda literatüre bakıldığında *Prunella vulgaris* L. türünde bulunan rosmarinik asit miktarı Cheung ve Zhang (2008) yaptığı çalışmaya göre daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılık bitkinin toplandığı farklı lokalite, uygulanan farklı analitik ve ekstraksiyon yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte hekzan ve hekzan-asit örneklerinde herhangi bir fenolik madde bulunmamıştır (Şahin ve ark. 2011b).

### **5.2.2. Ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin etkisi**

Çözücü ekstraksiyonu bitkilerde bulunan flavonoid ve fenolik asitler için en uygun ekstraksiyon yöntemidir. Fenolik bileşikler genellikle polar özellik gösterdiklerinden ekstraksiyon yönteminde kullanılan en yaygın çözücüler su, metanol, etil asetat, aseton ve bunların farklı asitli veya asitsiz karışımlarıdır. Bitkilerde bulunan fenolik maddelerin ekstraksiyon verimleri bu fenolik maddelerin kullanılan çözücülerdeki çözünürlüğüne bağlıdır. Bu nedenle fenolik maddelerin ekstraksiyonu için standart bir yöntem yoktur. Ayrıca asidik hidroliz yönteminde glikozit bağları parçalandığı için serbest fenolik maddelerde açığa çıkmaktadır. *Prunella* L. türlerinde bulunan fenolik

maddelerin ekstraksiyon işlemi sırasında su, metanol, butanol, etil asetat, asetonitril, hekzan ve bunların asidik karışımları kullanılmıştır. Fenolik maddelerin ekstraksiyonu için polar ve apolar çözücülerin etkisi karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.2.2.1). Çizelge 4.2.1.1–4.2.1.2'e bakıldığında çözücü polaritesinin fenolik maddelerin ekstraksiyon verimi üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Ekstraksiyon işleminde metanol kullanıldığında en yüksek miktarlarda fenolik maddelerin ekstrakte edildiği görülmektedir. Oysaki *Prunella laciniata* (L.) L. örnekleri için su kullanıldığında en yüksek miktarlarda fenolik maddelerin ekstrakte edildiği görülmektedir. Toplam fenol miktarlarına bakılınca asidik hidroliz yöntemi ekstraksiyon yöntemine göre daha avantajlı olduğu anlaşılmaktadır. Fenolik madde miktarlarına bakılınca asetonitril-asit, asidik hidroliz yöntemi için en uygun çözücüdür (Şahin ve ark. 2011b).

### 5.2.3. Analitik yöntem validasyonu

*Prunella* L. türlerinin fenolik bileşiklerinin miktarsal tayinlerinin validasyonunda her fenolik bileşiğin LOD, LOQ ve % geri kazanım değerleri (Çizelge 4.2.2.1) hesaplanmıştır. Analiz edilen fenolik bileşikler için LOD 0,07–0,14 mg/L ve LOQ 0,23–0,47 mg/L arasında değişmektedir. *Prunella* L. türlerinde tayin edilen standart fenolik bileşiklerden hazırlanan karışımın metanol ve metanol-asit katılmasıyla hazırlanan ekstraktlara göre fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimi tayin edildi (Çizelge 4.2.2.1). Fenolik bileşiklerin geri kazanım çalışması HPLC-DAD ile yapıldı. Fenolik bileşiklerin ortalama geri kazanım değerlerinin ekstraksiyon yöntemi için %82±3 (rutin)-102±2 (kuersetin, ferulik asit) asidik hidroliz yöntemi için %51±1 (rutin)-102±1 (ferulik asit) arasında değiştiği bulunmuştur. *Prunella* L. türlerinde ekstraksiyon yöntemi için en düşük geri kazanım değeri %82±3 rutine ait iken asidik hidroliz yöntemi için de %51±1 rutine aittir. Rutin bir kuersetin glikoziti olduğu için asidik hidroliz yönteminde yapısı parçalanmaktadır. Bu nedenle asidik hidroliz yöntemi için bulunan geri kazanım değeri ekstraksiyon yöntemi için bulunan geri kazanım değerinden küçüktür. Bununla birlikte flavonoid ekstraksiyonu için en uygun yöntem asidik hidrolizdir. *Prunella* L. türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları hesaplanırken geri kazanım değerleri dikkate alınmıştır (Şahin ve ark. 2011b).

#### 5.2.4. LC-MS tayinleri

Bu çalışmada *Prunella* L. türlerinin (*Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L.) su, su-asit, metanol, metanol-asit, etil asetat ve etil asetat-asit ekstraktlarında bulunan muhtemel fenolik maddeler LC-MS ile kalitatif olarak belirlendi. LC-MS analizleri sonucu *Prunella* L. türlerinde bulunabilecek muhtemel fenolik maddeler; kamferol glikozit, kuersetin glikozit ve kamferoldür (Çizelge 4.2.3.1). Buna göre kamferol glikozit; *Prunella vulgaris* L. metanol ekstraktı, kuersetin glikozit; *Prunella vulgaris* L. su-asit ekstraktı, *Prunella laciniata* (L.) L. su ve su-asit ekstraktı, kamferol; *Prunella vulgaris* L. metanol-asit ekstraktı ve *Prunella laciniata* (L.) L. metanol ekstraktında kalitatif olarak tayin edilmiştir.

### 5.3. Kemometrik Yöntemler

#### 5.3.1. Toplam fenol tayinleri

2009 yılında toplanan *Prunella* L. türlerinin su, metanol, etil asetat, asetonitril, butanol, hekzan ve bunların asidik ekstraktlarının toplam fenol tayinleri Folin yöntemi ile yapılmıştır. Genel olarak hekzan ve hekzan-asit dışındaki çözücü ve çözücü karışımlarının toplam fenol ekstraksiyonunda etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3.1.1). Ayrıca polar olan çözücülerin (asit eklenmemiş) toplam fenol değerleri de polar olmayan çözücülere göre daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte asidik hidroliz yöntemi ise flavonoid ekstraksiyonu için en uygun ekstraksiyon yöntemidir. Çünkü asidik hidroliz ile glikozit bağları parçalanmakta ve serbest fenolik madde açığa çıkmaktadır. Folin yöntemi ile bulunan toplam fenol değerleri ekstraksiyon yönteminde 1,00–24,63 mg/g örnek, asidik hidroliz yönteminde 1,24–87,33 mg/g örnek arasında değişim göstermektedir. Bütün *Prunella* L. türlerinin aynı çözücü ekstraktlarının toplam fenol değerleri birbirine yakın değerlerdedir. Ekstraksiyon yöntemine göre *Prunella grandiflora* L. metanol ekstraktı en yüksek toplam fenol değeri, hekzan ekstraktları ise en az toplam fenol değeri içermektedir. Asidik hidroliz yöntemine göre *Prunella vulgaris* L. etil asetat-asit ekstraktı en yüksek toplam fenol değeri, hekzan-asit ekstraktları ise en az toplam fenol değeri içermektedir. Folin yöntemi ile bulunan

toplam fenol değerlerindeki çözücü etkisi Şu Şekildedir: etil asetat-asit> asetonitril-asit> su-asit> butanol-asit> metanol-asit> metanol> su> butanol> asetonitril> etil asetat > hekzan-asit> hekzan. Literatüre bakıldığında *Prunella vulgaris* L. su ve metanol toplam fenol değerleri Li ve ark. (2008), Cai ve ark. (2004) yaptığı çalışmaya göre daha yüksek bulunmuştur.

### 5.3.1.1. PCR ve PLS

Bu çalışmada çok değişkenli kalibrasyon teknikleri ile *Prunella* L. türleri ekstraktlarının toplam fenol tayinleri yapıldı. Çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden PCR ve PLS ile toplam fenol tayinlerinde kalibrasyon ve test setler kullanıldı. Kalibrasyon ve test setlerin nasıl oluşturulduğu bölüm 3.2.4'te açıklanmıştır. PCR ve PLS ile bulunan tahmini toplam fenol değerleri ile gerçek toplam fenol değerleri karşılaştırıldığında bulunan hata değerleri Çizelge 4.3.1.2'de verilmiştir. Hata değerlerine bakıldığında PLS ile bulunan toplam fenol değerleri için hatalar daha az azdır. Buna göre PLS ile toplam fenol değerleri gerçek değerlere daha yakın tahmin edilmiştir. Bununla birlikte toplam fenol değerlerinin kemometrik yöntemler ile tahmin edilmesinde farklı veri hazırlama teknikleri de karşılaştırılmıştır.

Kromatogramlar arası alıkonma zamanlarındaki kaymaları önlemek için öncelikle bütün kromatogramlar COW yöntemi ile analize hazırlanmıştır. Çizelge 4.3.1.2'ye bakıldığında kalibrasyon seti için merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan hata değerlerinin en az olduğu görölmektedir. Ayrıca PCR yöntemi için hem merkezileştirme hem de sinyal düzleştirme, normalizasyon ve merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan hata değerleri birbirine çok yakındır. Bununla birlikte PLS yöntemi için merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan hata değerleri sinyal düzleştirme, normalizasyon ve merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan hata değerlerine daha düşük bulunmuştur. Bu çalışmada kemometrik yöntemler ile toplam fenol değerleri tahmin edildiğinde PLS ile merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan toplam fenol değerleri gerçek toplam fenol değerlerine çok yakın bulunmuştur. Şekil 4.3.1.1'e bakıldığında da gerçek toplam fenol değerleri ile tahmini toplam fenol değerleri arasındaki regresyon katsayısı PCR için 0,9568, PLS için ise 0,9938 bulunmuştur.

PLS ve PCR yöntemleri ile hesaplanan skor değerleri ile çizilen skor grafiklerinden ekstraktlar arasındaki grup oluşumları hakkında bilgi edinilebilmektedir. Buna göre PLS'e göre merkezileştirilmiş veri için çizilen skor grafiklerinde toplam fenol değerlerine göre 3 farklı grup oluşumu görülmektedir (Şekil 4.3.1.2). Burada her bir ekstrakt bir sayı değeri ile ifade edilmiştir Ekstraktların toplam fenol değerlerinin birbirine olan yakınlığına göre oluşan gruplar *Prunella* L. türlerinin şu ekstraktlarını içermektedir: (I) etil asetat-asit, (örnekler 8-17-26-35), (II) asetonitril-asit (örnekler 7-16-25-34) ve (III) metanol (örnekler 1-10-19-28), asetonitril (örnekler 2-11-20-29), etil asetat (örnekler 3-12-21-30), hekzan (örnekler 4-13-22-31), su-asit (örnekler 5-14-23-32), butanol-asit (örnekler 6-15-24-33) ve hekzan-asit (örnekler 9-18-27-36). Grup (I) ve (II)'de bulunan ekstraktlara bakıldığında yüksek toplam fenol içeriğine sahip ekstraktlar aynı grupta bulunmaktadır. Bununla birlikte *Prunella* L. türlerinin aynı çözücü ekstraktları benzer toplam fenol değerlerine sahip olduğu için aynı grupta bulunmaktadır.

Kemometrik yöntemlerle yapılan bu çalışmaların bir diğer amacı ise toplam fenole katkısı olan standartların olmaması nedeni ile kromatografik olarak tayin edilemeyen fenolik maddelerin belirlenmesidir. Bu amaçla merkezileştirilmiş veri için PLS loading değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.3.1.3). PLS loading grafiğindeki negatif pikler toplam fenol değerlerini artırırken pozitif pikler azaltmaktadırlar. 9,54; 24,52 ve 25,40 dk bulunan negatif PLS loading değerine sahip pikler toplam fenol değerlerini artıran fenolik maddelere ait piklerdir. *Prunella* L. türlerinde bulunan fenolik maddeler; rosmarinik asit, kafeik asit, rutin, kuersetin, kamferol, ferulik asit, protokatekuik asit ve klorojenik asittir. Rosmarinik asit (25,40 dk) negatif PLS loading değerine sahiptir. Diğer taraftan kafeik asit (19,80 dk), rutin (22,60 dk), kuersetin (27,80 dk) ve kamferol (29.18 dk) pozitif PLS loading değerine sahiptir. Bununla birlikte 5,16; 5,40; 6,14; 6,73; 9,03; 9,53; 14,49; 25,16; 25,72; 27,2; 30,92 ve 32,15 dk'da pozitif PLS loading değerine sahip fenolik maddeler toplam fenol değerine azaltıcı katkıda bulunmaktadır. Bu maddelerin miktarları azalırken toplam fenol değerleri artmaktadır. Fenolik maddelerin toplam fenole olan katkısını belirlemek için *Prunella* L. metanol ekstraktının içine ayrı ayrı aynı miktarlarda rosmarinik asit, kafeik asit, rutin, kuersetin, kamferol eklenerek toplam fenol değerleri bulunmuştur. Ayrıca

*Prunella L.* metanol ekstraktının fenolik maddelerin hepsi eklenerek toplam fenol değeri bulunmuştur. Fenolik maddelerin ayrı ayrı bulunan toplam fenol değerlerinin (5 tane fenolik maddeden 1 tanesi olmadan) toplanması ile elde edilen değer, fenolik maddelerin 5 tanesinin (rosmarinik asit, kafeik asit, rutin, kuersetin, kamferol) birlikte bulunduğu ekstaktın toplam fenol değerleri ile karşılaştırılınca; ortamda rosmarinik asit miktarı artıkça toplam fenol değerlerinin arttığı belirlenmiştir.

### 5.3.2. Toplam antioksidan aktivite tayinleri

2009 yılında toplanan *Prunella L.* türlerinin su, metanol, etil asetat, asetonitril, butanol, hekzan ve bunların asidik ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite değerleri ABTS ve DPPH yöntemleri ile tayin edilmiştir. Çizelge 4.1.5.2’de ABTS yöntemi, Çizelge 4.1.5.3’te DPPH yöntemi ile bulunan toplam antioksidan aktivite değerleri verilmiştir. Genel olarak hekzan ve hekzan-asit dışındaki çözücü ve çözücü karışımlarının toplam fenol ekstraksiyonunda etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1.5.2-4.1.5.3). Ayrıca polar olan çözücülerin (asit eklenmemiş) toplam antioksidan aktivite değerleri de polar olmayan çözücülere göre daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte ABTS ve DPPH yöntemine göre ekstraksiyon için en uygun çözücü metanol-asit bulunmuştur. Çünkü asidik hidroliz ile glikozit bağları parçalanmakta ve serbest fenolik madde açığa çıkmaktadır. ABTS yöntemine göre toplam antioksidan aktivite değerleri ekstraksiyon yöntemi için 0,44-201,04 mg troloks/g örnek, asidik hidroliz yöntemi için 0,69-343,57 mg troloks/g örnek arasında değişim göstermektedir. Bütün *Prunella L.* türlerinin aynı çözücü ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite değerleri birbirine yakın değerlerdir. Ekstraksiyon yöntemine göre *Prunella orientalis* Bornm. metanol ekstraktı en yüksek toplam antioksidan aktivite değerine sahip iken hekzan ekstraktları en düşük toplam antioksidan aktivite değerine sahiptir. Asidik hidroliz yöntemine göre *Prunella vulgaris L.* metanol-asit ekstraktı en yüksek toplam antioksidan aktivite değerine sahip iken hekzan-asit ekstraktları en düşük toplam antioksidan aktivite değerine sahiptir. ABTS yöntemine göre toplam antioksidan aktivite değerlerindeki çözücü etkisi şu şekildedir; metanol-asit> su-asit> metanol> su> butanol-asit> butanol> asetonitril-asit> etil asetat-asit> asetonitril > etil asetat> hekzan-asit> hekzan.

DPPH yöntemine göre toplam antioksidan aktivite değerleri ekstraksiyon yöntemi için 0,05-151,82 mg troloks/g örnek, asidik hidroliz yöntemi için 0,07-256,52 mg troloks/g örnek arasında değişim göstermektedir. Bütün *Prunella* L. türlerinin aynı çözücü ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite değerleri birbirine yakın değerlerdir. Ekstraksiyon yöntemine göre *Prunella vulgaris* L. metanol ekstraktı en yüksek toplam antioksidan aktivite değerine sahip iken hekzan ekstraktları en düşük toplam antioksidan aktivite değerine sahiptir. Asidik hidroliz yöntemine göre *Prunella orientalis* Bornm. metanol-asit ekstraktı en yüksek toplam antioksidan aktivite değerine sahip iken *Prunella laciniata* (L.) L. ve *Prunella grandiflora* L. hekzan-asit ekstraktları en düşük toplam antioksidan aktivite değerine sahiptir. DPPH yöntemine göre toplam antioksidan aktivite değerlerindeki çözücü etkisi şu şekildedir; metanol-asit> metanol> su-asit> su> butanol-asit> asetonitril-asit> etil asetat-asit> butanol> asetonitril > etil asetat> hekzan-asit> hekzan.

ABTS ve DPPH yöntemleri farklı ilkelere ve deneysel koşullara sahip antioksidan aktivite yöntemleridir. Kompleks örneklerde bulunan antioksidan maddelerin farklı reaksiyon mekanizmalarına karşı farklı deneysel koşullarda göstereceği davranış farklı olacaktır. Bu nedenle kompleks örneklerin toplam antioksidan aktivite tayinleri birden fazla antioksidan aktivite yöntemine göre yapılmalıdır. *Prunella* L. türlerinin genel olarak toplam fenol değerleri ile toplam antioksidan aktivite değerleri arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Ekstraksiyon metoduna bakıldığında metanol ekstraktlarının toplam fenol değeri (Çizelge 4.3.1.1) en yüksek iken toplam antioksidan aktivite (Çizelge 4.1.5.2-4.1.5.3) değeri de en yüksektir. Ancak asidik hidroliz metoduna bakıldığından toplam fenol değeri en yüksek olan etil asetat-asit ekstraktları (Çizelge 4.3.1.1) iken toplam antioksidan aktivite değeri en yüksek olan metanol-asit ekstraktlarıdır (Çizelge 4.1.5.2-4.1.5.3). Buna göre toplam fenol değeri yüksek olan örneklerin farklı deneysel koşullarda göstereceği davranış (katkı) farklı olacağı için toplam antioksidan aktivite değerleri de farklıdır.



### 5.3.2.1. PLS ve OSC-PLS

Bu çalışmada çok değişkenli kalibrasyon teknikleri ile *Prunella L.* türleri ekstraktlarının toplam antioksidan aktivite tayinleri yapıldı. Çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinden PLS ve OSC-PLS ile toplam antioksidan aktivite tayinlerinde kalibrasyon ve test setler kullanıldı. Kalibrasyon ve test setlerin nasıl oluşturulduğu bölüm 3.2.4'te açıklanmıştır. PLS ve OSC-PLS ile bulunan tahmini toplam antioksidan aktivite değerleri ile gerçek toplam antioksidan aktivite değerleri karşılaştırıldığında bulunan hata değerleri Çizelge 4.3.2.1'de verilmiştir. Hata değerlerine bakıldığında OSC-PLS ile bulunan toplam antioksidan aktivite değerleri için hatalar daha azdır. Buna göre OSC-PLS ile toplam antioksidan aktivite değerleri gerçek değerlere daha yakın tahmin edilmiştir. Bununla birlikte toplam antioksidan aktivite değerlerinin kemometrik yöntemler ile tahmin edilmesinde farklı veri hazırlama teknikleri de karşılaştırılmıştır.

Kromatogramlar arası alıkonma zamanlarındaki kaymaları önlemek için öncelikle bütün kromatogramlar COW yöntemi ile analize hazırlanmıştır. Çizelge 4.3.2.1'e bakıldığında kalibrasyon seti için OSC-PLS yöntemine göre merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan hata değerleri sinyal düzeltme, normalizasyon ve merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan hata değerlerinden düşük olduğu görülmektedir. PLS yöntemi için sinyal düzeltme, normalizasyon ve merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan hata değerleri merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan hata değerlerinden daha düşüktür. Bu çalışmada kemometrik yöntemler ile toplam antioksidan aktivite değerleri tahmin edildiğinde PLS ve OSC-PLS karşılaştırıldığında OSC-PLS ile merkezileştirme yapıldıktan sonra bulunan toplam antioksidan aktivite değerleri gerçek toplam antioksidan aktivite değerlerine çok yakın bulunmuştur. Şekil 4.3.2.1'e bakıldığında gerçek toplam antioksidan aktivite değerleri ile OSC-PLS ile hesaplanan tahmini toplam antioksidan aktivite değerleri arasındaki regresyon katsayısı ABTS için 0,999, DPPH için ise 0,999 bulunmuştur. OSC-PLS metodu ile X veri matrisi üzerinden gürültü etkisi kaldırıldığı için OSC-PLS ile bulunan hata değerlerinin düşük bulunmuştur.

PLS ve OSC-PLS yöntemleri ile hesaplanan skor değerleri ile çizilen skor grafiklerinden ekstraktlar arasındaki grup oluşumları hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Buna göre OSC-PLS'e göre merkezileştirilmiş veri için çizilen skor grafiklerinde toplam antioksidan aktivite değerlerine göre 2 farklı grup oluşumu görülmektedir (Şekil 4.3.2.2). Burada her bir ekstrakt bir sayı değeri ile ifade edilmiştir Ekstraktların ABTS yöntemi için toplam antioksidan aktivite değerlerinin birbirine olan yakınlığına göre oluşan gruplar *Prunella L.* türlerinin şu ekstraktlarını içermektedir: (I) asetonitril (örnekler 2-11-20-29), etil asetat (örnekler 3-12-21-30), hekzan (örnekler 4-13-22-31), asetonitril-asit (örnekler 7-16-25-34), etil asetat-asit (örnekler 8-17-26-35), hekzan-asit (örnekler 9-18-27-36) ve butanol (örnek 19), (II) metanol (örnekler 1-10-28), su-asit (örnekler 5-14-23-32), butanol-asit (örnekler 6-15-24-33) (Şekil 4.3.2.2.a). Ekstraktların DPPH yöntemi için toplam antioksidan aktivite değerlerinin birbirine olan yakınlığına göre oluşan gruplar *Prunella L.* türlerinin şu ekstraktlarını içermektedir: (I) asetonitril (örnekler 2-11-20-29), etil asetat (örnekler 3-12-21-30), hekzan (örnekler 4-13-22-31), hekzan-asit (örnekler 9-18-27-36), (II) metanol (örnekler 1-10-28), su-asit (örnekler 5-14-23-32), butanol-asit (örnekler 6-15-24-33), asetonitril-asit (örnekler 7-16-25-34), etil asetat-asit (örnekler 8-17-26-35) ve butanol (örnek 19) (Şekil 4.3.2.2.b). ABTS ve DPPH yöntemleri için grup (II)'de bulunan ekstraktlara bakıldığında yüksek toplam antioksidan aktivite içeriğine sahip ekstraktlar aynı grupta bulunmaktadır. Bununla birlikte *Prunella L.* türlerinin aynı çözücü ekstraktları benzer toplam fenol değerlerine sahip olduğu için aynı grupta bulunmaktadır.

Kemometrik yöntemlerle yapılan bu çalışmaların bir diğer amacı ise toplam antioksidan aktiviteye katkısı olan fenolik maddelerin belirlenmesidir. Bu amaçla merkezileştirilmiş veri için OSC-PLS loading değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.3.2.3). OSC-PLS loading grafiğindeki negatif pikler toplam antioksidan aktivite değerlerini artırırken pozitif pikler azaltmaktadırlar. 5,40; 6,90; 9,67; 14,18; 14,58; 16,23; 19,67; 19,80; 22,60; 24,58; 25,40; 27,80; 29,18 ve 30,92 dk bulunan negatif PLS loading değerine sahip pikler toplam antioksidan aktiviteyi artıran fenolik maddelere ait piklerdir. *Prunella L.* türlerinde bulunan fenolik maddeler; rosmarinik asit, kafeik asit, rutin, kuersetin, kamferol, ferulik asit, protokatekuik asit ve klorojenik asittir. Klorojenik asit (14,58 dk), kafeik asit (19,80 dk), rutin (22,60 dk), ferulik asit (24,58 dk), rosmarinik asit (25,40 dk), kuersetin (27,80 dk) ve kamferol (29,18 dk) negatif PLS

loading değerine sahiptirler. Bu fenolik maddelerin miktarları artarken toplam antioksidan aktivite değerleri artmaktadır.

#### 5.4. İzolasyon Çalışmaları

##### 5.4.1. Fenolik maddelerin izolasyonu ve tayini

İzolasyon çalışmalarında kullanılan *Prunella* L. metanol ekstraktları yüksek fenolik madde miktarına (*Prunella grandiflora* L. için 26,64 mg/g örnek), toplam fenol içeriğine (*Prunella grandiflora* L. için 184,0 mg gallik asit/g örnek) ve toplam antioksidan aktiviteye (*Prunella grandiflora* L. için 83,4 mg troloks/g örnek) sahiptirler (Çizelge 4.4.1-4.4.2). *Prunella* L. metanol ekstraktlarının Sephadex LH-20 kolon kromatografisi izolasyonu sonucu *Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L. *Prunella grandiflora* L. için üç fraksiyon (Şekil 4.4.1-4.4.3) ve *Prunella orientalis* Bornm. için dört fraksiyon elde edilmiştir (Şekil 4.4.4). Sephadex LH-20 kolon kromatografisi sonucu elde edilen her bir fraksiyonun 280 nm’de absorbans ölçümleri ile HPLC-DAD cihazı ile kantitatif analizleri yapılmıştır.

HPLC-DAD analizleri sonucu *Prunella* L. türlerinin; *Prunella vulgaris* L., *Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella grandiflora* L., *Prunella orientalis* Bornm. metanol ekstraktlarında ve fraksiyonlarında rosmarinik asit, kafeik asit ve rutin kantitatif olarak tayin edildi (Çizelge 4.4.1). Fraksiyonlarda rutin 0,010±0,001-2,290±0,010 mg/g örnek, rosmarinik asit 0,020±0,001-14,880±0,190 mg/g örnek ve kafeik asit 0,060±0,010-0,008±0,010 mg/g arasında bulunmuştur. En yüksek rutin ve rosmarinik asit miktarı *Prunella grandiflora* L. metanol ekstraktı Fraksiyon 3’te ve kafeik asit miktarı *Prunella grandiflora* L. metanol ekstraktı Fraksiyon 2’te bulunmuştur. En az rutin ve rosmarinik asit miktarı *Prunella laciniata* (L.) L. metanol ekstraktı Fraksiyon 1’de ve kafeik asit miktarı *Prunella orientalis* Bornm. metanol ekstraktı Fraksiyon 3 ve *Prunella laciniata* (L.) L. metanol ekstraktı Fraksiyon 2’de bulunmuştur.

Ekstraktlarda bulunan rutin miktarı *Prunella vulgaris* L. için 1,120±0,240 mg/g örnek, *Prunella laciniata* (L.) L. için 0,760±0,010 mg/g örnek, *Prunella grandiflora* L. için

5,880±0,100 mg/g örnek ve *Prunella orientalis* Bornm. için 0,410±0,020 mg/g örnek bulunmuştur. Rosmarinik asit miktarı *Prunella vulgaris* L. için 13,900±1,760 mg/g örnek, *Prunella laciniata* (L.) L. için 14,980±0,110 mg/g örnek, *Prunella grandiflora* L. için 20,590±1,490 mg/g örnek, *Prunella orientalis* Bornm. için 7,040±0,250 mg/g örnek bulunmuştur. Bununla birlikte kafeik asit *Prunella vulgaris* L. ve *Prunella laciniata* (L.) L. için 0,060±0,010 mg/g örnek, *Prunella grandiflora* L. için 0,170±0,010 mg/g örnek, *Prunella orientalis* Bornm. için 0,050±0,010 mg/g örnek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre *Prunella* L. türlerinden %74 (*Prunella grandiflora* L.) - %99 (*Prunella orientalis* Bornm.) oranında fenolik madde izole edilmiştir. Standart fenolik maddeler (12,0 mg/L rutin, 9,1 mg/L rosmarinik asit, 14,9 mg/L kafeik asit) kullanılarak Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ile izolasyonu sonucu elde edilen fraksiyonların 280 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.4.5'e bakıldığında standart fenolik maddeler ile ekstraktların izolasyon sonrası fraksiyon profilleri benzer özellik göstermektedir. Standart fenolik maddelerden rutin %47,2; rosmarinik asit %52, kafeik asit %62,8 verimle izole edilmiştir. Literatüre bakıldığında rosmarinik asit için izolasyon verimi daha yüksek bulunmuştur (Kim ve ark. 2010).

#### **5.4.2. Toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite sonuçları**

Ekstraktların ve fraksiyonların toplam fenol tayinleri Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayinleri ise ABTS yöntemi ile yapıldı. Çizelge 4.4.2'de ekstraktların ve fraksiyonların toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değerleri verilmiştir. Buna göre *Prunella grandiflora* L. metanol ekstraktı Fraksiyon 3'ün toplam fenol (92,4±0,1 mg gallik asit/g örnek) ve toplam antioksidan aktivite değeri (44,9±0,4 mg troloks/g örnek) en yüksektir. *Prunella orientalis* Bornm. metanol ekstraktı Fraksiyon 2 ise en az toplam fenol (1,0±0,1 mg gallik asit/g örnek) ve toplam antioksidan aktivite değerine (0,4±0,1 mg troloks/g örnek) sahiptir. Toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değerlerine bakılınca *Prunella vulgaris* L. ve *Prunella laciniata* (L.) L. örneklerinin yakın değerlere sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değeri en yüksek olan *Prunella grandiflora* L. metanol ekstraktı Fraksiyon 3'ün rosmarinik asit ve rutin miktarları da en yüksektir.

Ekstraktların toplam fenol değerleri *Prunella vulgaris* L. için  $97,0\pm 2,4$  mg gallik asit/g örnek, *Prunella laciniata* (L.) L. için  $93,4\pm 3,1$  mg gallik asit/g örnek, *Prunella grandiflora* L. için  $184,0\pm 3,5$  mg gallik asit/g örnek ve *Prunella orientalis* Bornm. için  $56,1\pm 1,9$  mg gallik asit/g örnek bulunmuştur. Toplam antioksidan aktivite değerleri *Prunella vulgaris* L. için  $46,2\pm 2,6$  mg troloks/g örnek, *Prunella laciniata* (L.) L. için  $55,4\pm 1,5$  mg troloks/g örnek, *Prunella grandiflora* L. için  $83,4\pm 0,6$  mg troloks/g örnek ve *Prunella orientalis* Bornm. için  $33,6\pm 0,1$  mg troloks/g örnek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değerleri yüksek olan *Prunella* L. türleri antioksidan özellikli destek maddesi olarak kullanılabilir. Toplam fenol, toplam antioksidan aktivite ve fenolik madde içeriği en yüksek olan *Prunella grandiflora* L. metanol ekstraktı Fraksiyon 3'e bakıldığında *Prunella* L. türlerinde bulunan başlıca fenolik maddeler rutin ve rosmarinik asittir. Rosmarinik asit ise en temel fenolik maddedir.

### **5.5. *Prunella* L. Türlerinin Antikanserojenik Özelliklerinin İncelenmesi**

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Onkogram Laboratuvarında çalışan araştırmacılar tarafından *Prunella* L. türlerinin liyofilize edilmiş su ekstraktlarının antikanserojenik özellikleri incelenmiştir. Yapılan ön deneme çalışmalarında örneklerin, insan meme kanseri hücrelerini yüksek oranlarda inhibe ettiği görülmüştür. Tez kapsamında olmayan bu çalışmalara devam edilecektir.

### **5.6. Sonuç**

Günümüzde yapılan pek çok çalışmada hastalıkların tedavisinde yeni olanaklar araştırılırken sağlıklı bir yaşam sürdürme, kalp krizi ve kanser gibi hastalıkları önleme yolunda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu hastalıkların etkilerinin önlenmesinde en etkili maddeler antioksidanlardır. Vücudumuzda biriken toksik maddeleri atmak ve onların zararlı etkilerinden kurtulmak için antioksidan maddeler içeren besinler alınması gereklidir. Böylece serbest radikallerin meydana getirdiği hücre tahribatı büyük ölçüde önlenmiş olur. Bu nedenle pek çok çalışmada da bitkilerde bulunan antioksidan ve fenolik maddelerin etkisi ve rolü vurgulanmaktadır.

*Prunella* L. türleri (*Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella vulgaris* L., *Prunella orientalis* Bornm, *Prunella grandiflora* L.) üzerinde yapılan çalışmalarda; bu türün antienflamatuvar, antiviral, antikanser, antioksidan ve antihiperglisemik özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. İnsan sağlığı için önemli yararlı özellikleri olduğu bilinen bu bitki türleri ülkemizin farklı illerinden toplanmıştır. Toplanan bitki türleri 12 farklı çözücü ortamında ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon çalışmalarında farklı polariteye ve pH değerine sahip çözücüler seçilmiştir. Burada amaç bitkilerde bulunan fenolik maddelerin ekstraksiyonu için en uygun çözücünün seçilmesidir. Ekstrakte edilen örnekler HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda fenolik madde olarak rosmarinik asit, rutin, kuersetin, kafeik asit, protokatekuik asit, ferulik asit ve klorojenik asit tayin edilmiştir. Bu fenolik maddeler için en uygun ekstraksiyon işleminin asidik hidroliz olduğu anlaşılmıştır.

Tarafımızdan geliştirilen yeni bir yöntem ile ekstraktların toplam fenol tayinleri yapılmıştır. Bu yöntemde STR-DVB-PGA polimerine immobilize edilen HRP enzimi ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 4-aminoantipirin varlığında oluşan renkli kuinon-imin ürününe bağlı olarak toplam fenol tayinleri yapıldı. İmmobilize enzim yöntemi ile bulunan toplam fenol değerleri, Folin ve serbest enzim ile bulunan toplam fenol değerleri ile karşılaştırılmıştır. Yöntemler karşılaştırıldığında sonuçlar arasındaki korelasyon değerleri 0,70'den büyüktür. Ayrıca her bir ekstraktın toplam antioksidan aktivite tayini ABTS ve DPPH yöntemleri ile yapılmıştır. Kemometrik yöntemler ile ekstraktların toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite hesaplamaları yapılmış, tahmini değerler gerçek değerlerle uyumlu bulunmuştur. Kemometrik hesaplamalar sonucunda toplam fenole ve toplam antioksidan aktiviteye katkısı olan fenolik maddeler belirlenmiştir.

Tez kapsamında toplam fenol ve toplam antioksidan aktivite değerleri yüksek olan metanol ekstraktlarının izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda temel fenolik madde olan rosmarinik asit, rutin ve kafeik asit yüksek miktarlarda izole edilmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda *Prunella* L. türlerinin yüksek miktarda fenolik madde içeriğine ve antioksidan aktivite özelliğine sahip olduğu anlaşılmıştır. Genel olarak

literatürde yapılan çalışmalar *Prunella vulgaris* ile ilgidir. *Prunella laciniata* (L.) L., *Prunella orientalis* Bornm ve *Prunella grandiflora* L. ile ilgili çalışmaların olmaması bu tezin en orijinal özelliğidir. Böylelikle bu bitki türlerinin de kullanılabilirliği hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Yapılan ön deneme çalışmalarında da bu bitki ekstraktlarının insan meme hücrelerini yüksek oranda inhibe etme özelliğine sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmalar, bu bitki türlerinin antikanser özellikli ilaç hammaddesi veya kanser tedavisinde hastalara takviye ürün olarak kullanılabilirliği ile ilgili gelecek çalışmalara ışık tutacaktır. Her geçen gün dünyada kanser hastalarının sayısı artmaktadır. Bu nedenle doğal ürünlerin içeriğinin ve hastalıklara karşı kullanılabilirliğinin araştırılması önem kazanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moller, C.R., Weichold, O., Hoch, U., Haring, D., Schreier, P. 1999.** Biotransformation with peroxidases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 63: 73-108.
- Agbor-Egbe, T., Rickard, J.E. 1990.** Identification of phenolic compounds in edible aroids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51: 215–221.
- Ahmed, J.H, Ezer N. 2008.** *Prunella* L. türlerinin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28(1): 93-113.
- Akasbi, M., Shoeman, D.W., Csallany, A.S. 1993.** High performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70: 367–370.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. 2000.** Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125: 989–1009.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B.K., Berker, K.I., Özyurt D. 2007.** Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds, and the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.
- Areias, F.M., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreres, F., Seabra, R.M. 2001.** Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chemistry*, 73: 307-311.
- Arts, I.C., van de Putte, B., Hollman, P.C.H. 2000.** Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, stable foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1746–1751.
- Aybastier, Ö., Demir, C. 2010.** Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene–divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63: 170–178.
- Azar, M., Verette, E., Brun, S. 1987.** Identification of some phenolic compounds in bilberry juice *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Food Science*, 52: 1255–1257.
- Baytop, T. 2000.** Anadolu Dağlarında 50 yıl, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Bennet, R.C., Wallsgrove, R.M. 1994.** Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley Review No. 72. *New Phytologist*, 127: 617–633.
- Bernards, M.A., Lewis, N.G. 1992.** Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochemistry*, 31: 3409–3412.
- Bertelsen, G., Christophersen, C., Nielsen, P.H., Madsen, H.L., Stadel P. 1995.** Chromatographic isolation of antioxidants guided by a methyl linoleate assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1272-1275.
- Bertran, E., Iturriaga, H., Maspoch, S., Montoliu, I. 2001.** Effect of orthogonal signal correction on the determination of compounds with very similar near infrared spectra. *Analytica Chimica Acta*, 431: 303-311.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254



- Brereton, R.G. 1997.** Multilevel multifactor designs for the multivariate calibration. *Analyst*, 122(12): 1521-1529.
- Britsch, L., Grisebach, H. 1985.** Improved preparation and assay of chalcone synthase. *Phytochemistry*, 24: 1975–1976.
- Britton, G. 1983.** The Biochemistry of Natural Pigments. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 366 pp.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74: 2157–2184.
- Careri, M., Mangia, M., Musci, M. 1998.** Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: Naturally occurring substances in food. *Journal of Chromatography A*, 794: 263–297.
- Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R., Facino, R.M. 2001.** LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24: 517-526.
- Chan, T., Galati, G., O'brien, P.J. 1999.** Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chemico- Biological Interactions*, 122:15-25.
- Cheung, H.-Y., Zhang, Q.-F. 2008.** Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. *Journal of Chromatography A*, 1213: 231–238.
- Chiavari, G., Concialini, V., Galletti, G.C. 1988.** Electrochemical detection in the high-performance liquid chromatographic analysis of plant phenolics. *Analyst*, 113: 91–94.
- Chiu, L.C.-M., Zhu, W., Ooi, V.E.-C. 2004.** A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of *Herpes simplex* virus antigen in Vero Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1): 63-68.
- Cogne, A.-L., Queiroz, E.F., Wolfender, J.-L., Marston, A., Mavi, S., Hostettmann, K. 2003.** On-line identification of unstable catalpol derivatives from *Jamesbrittenia fodina* by LC-MS and LC-NMR. *Phytochemical Analysis*, 14: 67-73.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berst, C. 1992.** Comparison of the Antioxidative Activity of Some Phenolic Acids: Structure-Activity Relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56: 324-325.
- Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Kosar, M., Hiltunen, R. 2007.** Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *Lwt-Food Science and Technology*, 40: 239-248.
- Davis, P.H. 1988.** Flora of Turkey and East Aegean Islands, Ed: Kit Tan, Vol. 10, Supplement. Edinb. Un. Press, Edinburgh.
- De Heer, M.I., Korth, H.G., Mulder, P. 1999.** Polymethoxy Phenols in Solution: O-H Bond Dissociation Enthalpies, Structures and Hydrogen Bonding. *Journal of Organic Chemistry*, 64: 6969-6975.

- de Pascual-Teresa, S., Treutter, D., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. 1998.** Analysis of Flavanols in Beverages by High-Performance Liquid Chromatography with Chemical Reaction Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4209-4213
- de Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A. 2004.** Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 995-1006.
- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., B, Gooijer, C., Brinkman, U.A.T. 2006.** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112: 31–63.
- Delage, E., Baron, G.B., Drilleau, J-F. 1991.** High-performance liquid chromatography of the phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties. *Journal of Chromatography A*, 555: 125-136.
- Demir, C. 1997.** Detection of Metabolites by GC-MS and Analysis of Mixtures by Chemometrics. *Doktora Tezi*, Bristol University, Chemistry Department, Bristol, UK.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. 1995.** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085–1097.
- Dmitruk, S.I., Dmitruk, S.E., Khoruzhaya, T.G., Berezovskaya, T.P. 1985.** Pharmacognostic study of *Prunella vulgaris*. *Rastit Resur*, 21(4): 463-469.
- Dmitruk, S.I., Dmitruk, S.E., Berezovskaya, T.P., Prishchep, T.P. 1987.** Flavones of *Prunella 13 vulgaris*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 3: 449-450.
- Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R. 2003.** Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4563-4569.
- Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. 2004.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 762-770.
- Dubber, M.-J., Sewram, V., Mshicileli, N., Shephard, G.S., Kanfer, I. 2005.** The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37 (4): 723-731.
- Edmondson, J.R. 1982.** “*Prunella* L.”, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Ed.: Davis, P.H., University Press, Edinburg, Vol. 7, pp: 295-297.
- Eilers, P.H.C. 2003.** A Perfect Smoother. *Analytical Chemistry*, 75: 3631-3636.
- Erkan, N., Ayrancı, G., Ayrancı, E. 2008.** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110: 76–82.
- Erlund, I., Alfthan, G., Siren, H., Ariniemi, K., Aro, A. 1999.** Validated method for the quantitation of quercetin from human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 727: 179–189.

- Fernández de Simón, B., Pérez-Ilzarbe, J., Hernández, T., Gómez-Cordovés, C., Esterella, I. 1990.** HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatographia*, 30: 35–37.
- Fernández de Simón, B., Pérez-Ilzarbe, J., Hernández, T., Gómez-Cordovés, C., Esterella, I. 1992.** Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1531–1535.
- Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D., Pilidis, G.A., Karayannis, M.I. 2000.** Synthesis and analytical applications of 4-aminopyrazolone derivatives as chromogenic agents for the spectrophotometric determinations of phenols. *Analytica Chimica Acta*, 403: 315-323.
- Fiamegos, Y.C., Nanos, C.G., Vervoort, J., Stalikas, C.D. 2004.** Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography A*, 1041: 11-18.
- Finger, A., Engelhardt, U.H., Wray, V. 1991.** Flavonol glycosides in tea - kaempferol and quercetin rhamnoglucosides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55: 313–321.
- Finotti, E., Di Majo, D. 2003.** Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung*, 47: 186-187.
- Folin, O., Denis, W. 1912.** Tyrosine in proteins as determined by a new colorimetric method. *Journal of Biological Chemistry*, 12:245-251.
- Folin, O., Ciocalteu, V. 1927.** On tyrosine and tryptophan determinations in proteins *Journal of Biological Chemistry*, 73:627-650.
- Friedman, M., Jurgens, H.S. 2000.** Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2101-2110.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G. 2000.** Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597-3604.
- Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J.X. O'brien, P.J. 2002.** Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 177: 91-104
- Galensa, R., Herrmann, K. 1980.** Analysis of flavonoids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 189: 217–224.
- Gherman, C., Culea, M., Cozar, O., 2000.** Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. *Talanta*, 53: 253-262.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. 2001.** Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy in Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Ed.: JohnWiley & Sons, New York, p F1.2.1-F1.2.13.
- Goupy, P.M., Varoquaux, P.J.A., Nicolas, J.J., Macheix, J.J. 1990.** Identification and localization of hydroxycinnamoyl and flavonol derivatives from endive (*Cichorium endivia* L. cv. geante Maraichere) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 2116–2121.
- Gross, G.G. 1981.** Phenolic acids: The Biochemistry of Plants, Ed.: Stumpf, P.K., Conn, E.E., New York, USA, Academic Press, pp: 301–316.

- Haddock, E.A., Gupta, R.K., Al-Shafi, S.M.K., Layden, K., Haslam, E., Magnolato, D. 1982.** The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. *Phytochemistry*, 21: 1049–1062.
- Hahlbrock, K., Sheel, D. 1989.** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 347–369.
- Harborne, J. B., Simmonds, N. W. 1964.** *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, 101 pp.
- Harborne, J.B. 1988.** The flavonoids: recent advances: Plant Pigments, Ed.: Goodwin, T.W., London, England, Academic Press, pp: 299–343.
- Harborne, J.B. 1994.** *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, London, UK, Chapman & Hall, 676 pp.
- Harborne, J.B. 1998.** *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, London, UK, Chapman & Hall, 302 pp.
- Hartley, R.D., Morrison, W.H. 1991.** Monomeric and dimeric phenolic acids released from cell walls of grasses by sequential treatment with sodium hydroxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55:365-375.
- Hertog, M.G.L. 1994.** Flavonols and flavones in foods and their relation with cancer and coronary heart disease. *Doktora Tezi*, Agricultural University Wageningen, State Institute for Quality Control of Agricultural Products, Wageningen, The Netherlands, ve National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.
- Jain, M., Saxena, V.K. 1984.** Chemical examination of the fat from the leaves of *Prunella vulgaris*. *India Journal of Chemistry*, 56(3): 133-134.
- Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T. 1998.** Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799: 101–110.
- Kageyama, S., Kurokawa, M., Shiraki, K. 2000.** Extract of *Prunella vulgaris* spikes inhibits HIV replication at reverse transcription *in vitro* and can be absorbed from intestine *in vivo*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 11(2): 157-164.
- Kanes, K., Tisserat, B., Berhow, M., Vandercook, C. 1993.** Phenolic composition in various tissues of Rutaceae species. *Phytochemistry*, 32: 967–974.
- Kim, S., Yun, E.J., Bak, J.S., Lee, H., Lee, S.J., Kim, C.T., Lee, J.-H., Kim, K.H. 2010.** Response surface optimised extraction and chromatographic purification of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* leaves. *Food Chemistry*, 121: 521–526.
- Kivilompolo, M., Hyötyläinen, T. 2007.** Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145: 155-164.
- Kiehne, A., Engelhardt, U.H. 1996.** Thermospray -LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 202: 48–54.

- Klejdus, B., Vitamvasova, D., Kuban, V. 2001.** Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography–mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 450: 81-97.
- Koşar, M., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. 2005.** Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 91: 525-533.
- Kovatcheva, E., Pavlov, A., Koleva, I., Ilieva, M., Mihneva, M. 1996.** Rosmarinic acid from *Lavandula vera* MM cell culture. *Phytochemistry*, 43(6): 1243-1244.
- Kowalski, B.R., Grelach, R., Wold, H., 1982.** Chemical systems under indirect observation, Ed.: Jöreskog, K., Wold, H., North Netherlands, Amsterdam.
- Kozłowska, H., Rotkiewicz, D.A., Zadernowski, R., Sosulski, F.W. 1983.** Phenolic acids in rapeseed and mustard. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60: 1119-1123.
- Krygier, K., Sosulski, F., Hogge, L. 1982.** Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 2. Composition of phenolic acids in rapeseed flour and hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 334–336.
- Kuninori, T., Nishiyama, J. 1986.** Separation and quantitation of ferulic acid and tyrosine in wheat seeds (*Triticum aestivum*) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 362: 255–262.
- Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C. 1990.** Derives hydroxycinnamiques et flavonoides dans le genre *Prunella* (Lamiaceae): Activites antioxydantes et interet chimiotaxonomique. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 24(3): 152-157.
- Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A. 1991.** Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 66: 185-188.
- Lamuela-Raventós, R.M., Waterhouse, A.L. 1994.** A direct HPLC separation of wine phenolics. *American Society for Enology and Viticulture*, 45: 1–5.
- Lee H., Lin, J.-Y. 1988.** Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese Medicine. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 204(2): 229-234.
- Lee, K.-H., Lin, Y.-M., Wu, T.-S., Zhang, D.-C., Yamagishi, T., Hayashi, T., Hall, I.-H., Chang, J.-J., Wu, R.-Y., Yang, T.-H. 1988.** The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens* and *Hyptis capitata*: Ursolic acid and related derivatives. *Planta Medica*, 54: 308-311.
- Lee, H.S., Widmer, B.W. 1996.** Phenolic compounds: Handbook of Food Analysis Physical Characterization and Nutrient Analysis, Ed.: Nollet, L.M.L., New York, USA, Marcel Dekker, Inc., Vol 1, pp: 821–894.
- Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F. 2008.** Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*, 41: 385–390.
- Li, J., Ou-Lee, T-M, Raba, R., Amundson, R.G., Last, R.L. 1993.** Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell*, 5: 171–179.
- Liu, F., Ng, T.B. 2000.** Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sciences*, 66(8): 725-735.

- Liu, S., Jiang, S., Wu, Z., Lv, L., Zhang, J., Zhu, Z., Wu, S. 2002.** Identification of inhibitors of the HIV-1 gp41 six-helix bundle formation from extracts of Chinese medicinal herbs *Prunella vulgaris* and *Rhizoma cibotte*. *Life Sciences*, 71(15): 1779-1791.
- Lois, R. 1994.** Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta*, 194: 498–503.
- Lorber, A. 1986.** Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations. *Analytical Chemistry*, 58: 1167-1172.
- Ma, X., Tu, P., Chen, Y., Zhang, T., Wei, Y., Ito, Y. 2003.** Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 992: 193-197.
- Maas, J.L., Galletta, G.J., Wang, S.Y. 1992.** Ellagic acid enhancement in strawberries: Biotechnology and Nutrition, Ed.: Bills, D.D., Kung, S.-D., Storeham, USA, Butterworth-Heinemann, pp: 345–362.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J. 1990.** Fruit Phenolics. CRC Pres, Boca Raton, USA, 392 pp.
- Markham, K.R. 1982.** Techniques of Flavonoid Identification. Academic Pres, New York, USA, 113 pp.
- Markham, K.R. 1989.** Flavones, flavonols and their glycosides. Dey PM, Harborne JB, eds. Methods in Plant Biochemistry, Vol 1, Plant Phenolics. London, UK: Academic Pres, pp: 197–235.
- Marko-Varga, G., Barcelo, D. 1992.** Liquid chromatographic retention and separation of phenols and related aromatic compounds on reversed phase columns. *Chromatographia*, 34: 146–154.
- Matthiolus, P.A. 1626.** Kräuterbuch, Norinberg.
- Mattila, P., Astola, J., Kumpulainen, J. 2000.** Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5834–5841.
- McRae, K.B., Lidster, P.D., DeMarco, A.C., Dick, A.J. 1990.** Comparison of the polyphenol profiles of apple fruit cultivars by correspondence analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50: 329–342.
- Melgarejo, F.R., Lopez, J.N.R., Canovas, F.G., Ruiz, P.A.G. 2004.** Immobilization of horseradish peroxidase on cinnamic carbohydrate esters. *Process Biochemistry*, 39: 1455-1464.
- Merken, H.M., Beecher, G.R. 2000.** Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 577–599.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993.** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 84: 407–412.

- Miller, N.J., Rice-Evans, C. 1996.** Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2: 161–171.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A. 1997.** The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60: 331-337.
- Mo, Y., Nagel, C., Taylor, L.P. 1992.** Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 7213–7217.
- Morimoto, S., Goto, Y., Shoyama, Y. 1994.** Production of lithospermic acid-B and rosmarinic acid in callus-tissue and regenerated plantlets of *Salvia-Miltiorrhiza*. *Journal of Natural Products*, 57(6): 817-823.
- Mouly, P., Gaydou, E.M., Estienne, J. 1993.** Column liquid chromatographic determination of flavanone in Citrus. *Journal of Chromatography A*, 634: 129–134.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., Hara, Y. 1996.** Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21: 895-902.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A., Scaccini, C. 2002.** Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79: 119-124.
- Natherova, L., Rezacova, A. 1972.** Eine Pharmakognostische Studie über Drei Arten der Species Gattung *Prunella* L. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Comeniana*, 21: 33-61.
- Nielsen, N.P.V., Carstensen, J.M., Smedsgaard, J. 1998.** Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A*, 805: 17-35.
- Nolkemper, S., Reichling, J., Stintzing, F.C., Carle, R. Schnitzler, P. 2006.** Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against *Herpes simplex* virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Planta Medica*, 72(15): 1378-1382.
- Ogawa, A., Arai, H., Tanizawa, H., Miyahara, T., Toyooka, T. 1999.** On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 383: 221-230.
- Onyilagha, J., Bala, A., Hallett, R., Gruber, M., Soroka, J., Westcott, N. 2003.** Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family Brassicaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 1309–1322.
- Pandey, R.C., Misra, R. Rinehart, J.K.L. 1979.** Graft thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 169: 129–139.
- Parker, M.L., Waldron, K.W. 1995.** Texture of Chinese water chestnut: Involvement of cell wall phenolics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68: 337-346.
- Pietta, P., Facino, R.M., Carini, M., Mauri, P. 1994.** Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of flavonol glycosides from medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 661: 121–126.

- Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M.J., Nicoli, M.C. 2004.** Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 88: 201-207.
- Poon, G.K. 1998.** Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 794: 63–74.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.
- Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M. 2006.** Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, 95: 44-52.
- Psotova, J., Kola, M., Sousek, J., Ivagera, Z., Vicar, J., Ulrichova, J. 2003.** Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytotherapy Research*, 17: 1082–1087.
- Psotova, J., Chlopcikova, S., Miketova, P., Simanek, V. 2005.** Cytoprotectivity of *Prunella vulgaris* on doxorubicin-treated rat cardiomyocytes. *Fitoterapia*, 76(6): 556-561.
- Psotova, J., Svobodova, A., Kolarova, H., Walterova, D. 2006.** Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(3): 167-174.
- Pussayanawin, V., Wetzel, D.L. 1987.** High-performance liquid chromatographic determination of ferulic acid in wheat milling fractions as a measure of bran contamination. *Journal of Chromatography A*, 391: 243–255.
- Regnault-Roger, C., Hadidane, R., Biard, J.F., Boukef, K. 1987.** High performance liquid and thin –layer chromatographic determination of phenolic acids in palm (*Phoenix dactilifera*) products. *Food Chemistry*, 25: 61–71.
- Ribereau-Gayon, P. 1972.** Plant Phenolics, Hafner, New York, USA, 254 pp.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., 1994.** Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymology*, 234: 279–293.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933–956.
- Richardson, P.M. 1992.** The Chemistry of the lamiaceae: an introduction and overview. *Advances in Labiatae Science*, pp: 291-297.
- Robards, K., Antolovich, M. 1997.** Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Analyst*, 122: 11R–34R.
- Rodriguez-Arcos, R.C., Smith, A.C., Waldron, K.W. 2002.** Effect of storage on wall-bound phenolics in green asparagus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11): 3197-3203.
- Rojas-Melgarejo, F., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., García-Ruiz, P.A. 2004.** Immobilization of horseradish peroxidase on cinnamic carbohydrate esters. *Process Biochemistry*, 39: 1455-1464.



- Rommel, A., Wrolstad, R.E. 1993.** Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1237–1241.
- Ryu, S.Y., Chong-Kyo, L., Chong, O.L., Hae, S.K., Ok, P.Z., 1992.** Antiviral triterpens from *Prunella vulgaris*. *Archives of Pharmacal Research (Seoul)*, 15(3): 242-245.
- Saxena, V.R., Archana, S. 1984.** Flower pigments of *Brunella vulgaris* Roxb. *Acta Ciencia Indica*, 10(1): 37-38.
- Schmidt, T.J., Merfort, I., Willuhn, G. 1994.** Gas chromatography-mass spectrometry of flavonoid aglycones II. Structure-retention relationships and a possibility of differentiation between isomeric 6- and 8-methoxyflavones. *Journal of Chromatography A*, 669: 236–240.
- Seger, C., Godejohann, M., Tseng, L.-H., Spraul, M., Girtler, A., Sturm, S., Stuppner, H. 2005.** LC-DAD-MS/SPE-NMR Hyphenation. A Tool for the Analysis of Pharmaceutically Used Plant Extracts: Identification of Isobaric Iridoid Glycoside Regioisomers from *Harpagophytum procumbens*. *Analytical Chemistry*, 77: 878–885.
- Sellappan, S., Akoh, C.C., Krewer, G. 2002.** Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2432–2438.
- Sendra, J. 1963.** Phytochemical studies on *Prunella vulgaris* and *Prunella grandiflora*-flavonoids and phenolicarboxylic acids. *Dissertations Pharm.*, 15(4): 483-489.
- Señoráns, F.J., Ibañez, E., Cavero, S., Tabera, J., Reglero, G. 2000.** Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *Journal of Chromatography A*, 870: 491-499.
- Seo, A., Morr, C.V. 1984.** Improved high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean protein products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 530–533.
- Skottova, N., Kazdova, L., Oliyarnyk, O., Vecera, R., Sobolova, L., Ulrichova, J. 2004.** Phenolicsrich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacological Research*, 50(2): 123-130.
- Son, S., Lewis, B.A. 2002.** Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 468-472.
- Spribille, R., Forkmann, G. 1984.** Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flowerbuds of *Matthiola incana* R. Br. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 39c:714–719.
- Srisuma, N., Hammersschmidt, R., Uebersax, M.A., Ruengsakulrach, S., Bennink M.R., Hosfield, G.L. 1989.** Storage induced changes of phenolic acids and the development of hard-to-cook in dry beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Seafarer). *Journal of Food Science*, 54: 311–317.

- Stevanato, R., Fabris, S., Momo, F. 2004.** New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6287-6293.
- Strack, D. 1997.** Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Plant Biochemistry*. London, UK: Academic Press, pp: 387–416.
- Strube, M., Dragsted, L.O., Larsen, J.C. 1993.** Naturally occurring antitumourigens. I. Plant phenols. Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter 605. Copenhagen, Denmark: Nordic Council of Ministers.
- Sumaryono, W., Proksch, P., Hartmann, T., Nimtz, M., Wray, V. 1991.** Introduction of rosmarinic acid accumulation in cell-suspension cultures of orthosiphon-aristatus after treatment with yeast extract. *Phytochemistry*, 30(10): 3267-3271.
- Swain, T., Hillis, W.E. 1959.** The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10:63-68.
- Şahin S., Demir C., Malyer, H. 2011a.** Determination of total phenolic content of *Prunella* L. by immobilized enzyme bioreactor. *Analytical Methods*, 3: 944-950.
- Şahin, S., Demir, C., Malyer, H. 2011b.** Determination of phenolic compounds in *Prunella* L. by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55: 1227-1230.
- Tada, H., Muarakami, Y., Omoto, T., Shimomura, K., Ishimaru, K. 1996.** Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 42(2): 431-434.
- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G., Polissiou, M. 1995.** Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 699: 107–118.
- Temoçin, Z., Yiğitoğlu, M. 2009.** Studies on the activity and stability of immobilized horseradish peroxidase on poly(ethylene terephthalate) grafted acrylamide fiber. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32: 467-474.
- Tolonen, A., Uusitalo, J. 2004.** Fast screening method for the analysis of total flavonoid content in plants and foodstuffs by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry with polarity switching. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18: 3113–3122.
- Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I. 1992.** Chemistry and natural distribution of flavonoids in the lamiaceae. *Advances in Labiate Science*, pp: 299-309.
- Tomasi, G., van der Berg, F., Andersson, C. 2004.** Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. *Journal of Chemometrics*, 18: 231-241.
- Torres, A.M., Mau-Lastovicka, T., Rezaaiyan, R. 1987.** Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 921–925.

- van Beek, T.A., van Veldhuizen, A., Lelyveld, G.P., Piron, I., Lankhorst, P. 1993.** Quantitation of bilobalide and ginkgolides A, B, C and J by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, 4: 261-268.
- vande Castele, K., Geiger, H., van Sumere, C.F. 1983.** Separation of phenolics (benzoic acids, cinnamic acids, phenylacetic acids, miscellaneous phenolics) and coumarins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 258: 111-124.
- van Sumere, C.F., van Brussel, W., vande Castele, K., van Rompaey, Y. 1978.** Recent advances in the separation of plant phenolics: Biochemistry of Plant Phenolics: Recent Advances in Phytochemistry, Ed.: Swain, T., Harborne, J.B., van Sumere, C.F., New York, USA, Plenum Press, Vol 12, pp: 1-28.
- van Sumere, C.F. 1989.** Phenols and phenolic acids: Methods in Plant Biochemistry, Ed.: Dey, P.M., Harborne, J.B., London, UK, Academic Press, pp: 29-74.
- Veitch, N.C., Smith, A.T. 2001.** Horseradish peroxidase. *Advances in Inorganic Chemistry*, 51: 107-162.
- Vial, J., Noçairi, H., Sassiati, P., Mallipatu, S., Cognon, G., Thiébaud, D., Teillet, B., Rutledge, D.N. 2009.** Combination of dynamic time warping and multivariate analysis for the comparison of comprehensive two-dimensional gas chromatograms: Application to plant extracts. *Journal of Chromatography A*, 1216: 2866-2872.
- Vogt, T., Pollak, P., Tarlyn, N., Taylor, L.P. 1994.** Pollination or wound induced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. *Plant Cell*, 6: 11-23.
- Vojinović, V., Azevedo, A.M., Martins, V.C.B., Cabral, J.M.S., Gibson, T.D., Fonseca, L.P. 2004.** Assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by HRP catalysed co-oxidation of phenol-4-sulphonic acid and 4-aminoantipyrine: characterisation and optimisation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28: 129-135.
- Wallace, G., Fry, S.C. 1994.** Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 151: 229-267.
- Wang, H., Zhang, Z., Su, Z. 1994.** The constituents of the essential oil from three plants of the *Prunella*. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 29(11): 652-653.
- Wang, Z.H., Zhao, Y.Y., Wang, B., Al, T.M., Chen, Y.Y. 2000.** Depsides from *Prunella vulgaris*. *Chinese Chemical Letters*, 11(11): 997-1000.
- Waterman, P.G., Mole, S. 1994.** Analysis of Phenolic Plant Metabolites. The Methods in Ecology Series, Blackwell Scientific Publications, Ed.: Lawton, J.H., Likens, G., Oxford, UK, 248 pp.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940-949
- Wold, S., Antti, H., Lindgren, F., Öhman, J. 1998.** Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics Intelligent. Laboratory Systems*, 44: 175-185.
- Wolfenden, B.S., Willson, R.L. 1982.** Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,29-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of Chemical Society. Perkin Transactions 2*, 7: 805-812.

- Wu, W., Yan, C., Li, L., LiuZ., Liu S. 2004.** Studies on the flavones using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1047:213-220.
- Xu, H.-X., Lee, S.H.S., Lee, S.F., White, R.L., Blay, J. 1999.** Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research*, 44: 43–54.
- Yamasaki, K., Otake, T., Mori, H., Morimoto, M., Ueba, N., Kurokawa, Y., Shiota, K., Yuge, T. 1998.** Screening test of crude drug extract on anti-HIV activity. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 113(11):818-824.
- Yao, X.-J., Wainberg, M.A., Parniak, M.A. 1992.** Mechanism of inhibition of HIV-1 infection *in vitro* by purified extract of *Prunella vulgaris*. *Virology*, 187: 56-62.
- Yeşilada, E., Sezik, E. 1990.** Screening of some Turkish medicinal plants used in the treatment of rheumatoid arthritis and inflammatory diseases for their anti-inflammatory Activities. *Planta Medica*, 56: 659.
- Yeşil-Celiktas, O., Nartop, P., Gürel, A., Bedir, E., Vardar-Sukan, F. 2007.** Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1536-1542.
- Zgórk, G., Glowniak, K. 2001.** Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26: 79-87.
- Zhang, Y.-J., Yang, C.-R. 1995.** Two new ursane glycosides from *Prunella vulgaris* in France. *Acta Botanica Yunnanica*, 17(4): 468-472.
- Zhang, K.J., Zhang, M.Z., Wang, Q.D., Liu, W.L. 2006.** The experimental research about the effect of *Prunella vulgaris* L. on Raji cells growth and expression of apoptosis related protein, Zhong Yao Cai Zhongyaocai . *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 29(11): 1207-1210.
- Zheng, M. 1988.** An experimental study of antiviral action of 472 herbs on *Herpes simplex Virus*. *Journal Traditional Chinese Medicine*, 8(3): 203-206.
- Zheng, J., He, J., Ji, B., Li, Y., Zhang, X. 2007.** Antihyperglycemic activity of *Prunella vulgaris* L. in streptozotocin-induced diabetic mice. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16: 427-431.

## ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı : Saliha ŞAHİN
- Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 14.05.1980
- Yabancı Dili : İngilizce
- Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
- Lise : Bursa Kız Lisesi, 1998
- Lisans : Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 2002
- Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005
- Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2002- devam ediyor
- İletişim (e-posta) : salihabilgi@uludag.edu.tr
- Yayımları :
1. Bilgi, S., Demir, C. 2005. Identification of photooxidation degradation products of C.I. Reactive Orange 16 dye by gas chromatography-mass spectrometry. *Dyes and Pigments*, 66: 69-76.
  2. Şahin, S., Demir, C., Güçer, Ş. 2007. Simultaneous UV-vis spectrophotometric determination of disperse dyes in textile wastewater by partial least squares and principal component regression. *Dyes and Pigments*, 73: 368-376.
  3. Şahin, S., Sarıburun, E., Demir, C. 2009. Net analyte signal-based simultaneous determination of dyes in environmental samples using moving window partial least squares regression with UV-vis spectroscopy. *Analytical Methods*, 1: 208-214.
  4. Sarıburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., Uylaşer, V. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of Food Science*, 75(4): 328-335.
  5. Şahin S., Demir C., Malyer, H. 2011. Determination of total phenolic content of *Prunella* L. by immobilized enzyme bioreactor. *Analytical Methods*, 3: 944-950.
  6. Şahin, S., Demir, C., Malyer, H. 2011. Determination of phenolic compounds in *Prunella* L. by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55: 1227-1230.
  7. Sarıburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C. Determination of total phenolic content of raspberry and blackberry cultivars by immobilized horseradish peroxidase bioreactor. *Journal of Food Composition and Analysis*, doi:10.1016/j.jfca.2011.01.016 (online).

## ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

## TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	SALİHA ŞAHİN
Tez Adı	TÜRKİYE'DE YETİŞEN <i>PRUNELLA</i> L. TÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİNDE ANALİTİK METOTLAR
Enstitü	FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anabilim Dalı	KİMYA
Tez Türü	DOKTORA
Tez Danışman(lar)ı	PROF.DR. CEVDET DEMİR
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin Veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih :31.05.2011

İmza :