

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Thymus praecox Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*
EKSTRAKSTLARINDAKİ FENOLİK BİLEŞİKLERİN
KROMATOĞRAFİK VE SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ

Derya ÇAVUŞ
TEZ DANIŞMANI:
Yrd. Doç. Dr. Fatih İSLAMOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİMDALI

RİZE 2011

T.C
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Thymus praecox Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*
EKSTRAKSTLARINDAKİ FENOLİK BİLEŞİKLERİN
KROMATOĞRAFİK VE SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER İLE
BELİRLENMESİ

Derya ÇAVUŞ

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24/08 /2011

Tezin Savunma Tarihi : 09/09/2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Fatih İSLAMOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Oktay TORUL

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Miraç OCAK

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Fatih YILMAZ

RİZE 2011



ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programında yapıldı.

Yüksek lisans tez çalışmamın tüm aşamalarında bana her türlü çalışma imkanını veren sayın rektörümüz Prof. Dr. Arif YILMAZ'a ve sayın dekanımız Prof. Dr. Oktay TORUL'a,

Tezimle aynı ismi taşıyan 2010.102.02.1 sayılı projeme maddi destek sağlayan Rize Üniversite'si Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne,

Bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, eksilmeyen hoşgörüsü ve içtenliğiyle desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih İSLAMOĞLU' na,

Tez çalışmam boyunca bana inanıp bildiklerini tüm hoşgörüsüyle sunan, fikirleriyle yön veren, bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra manevi desteğini hiç esirgemeyen benim bütün nazımı çeken sevgili hocam Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY'a,

Her zaman tek kelime etmeme ihtiyaç duymadan yardımına koşan, bilgi, tecrübe, sevgi, ilgi maneviyat adına ne varsa canla başla önüme seren sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Emine SELVİ KILIÇKAYA'ya, Kimyager İsmail AKSU'ya, Kimyager Adem DEMİR'e,

Bitkilerin toplanıp kurutulmasında bana yardımcı olan baharatçı Mustafa LEZGİOĞLU' na,

Tezimin yazım aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen biricik kardeşim İmren ÇAVUŞ'a,

Eğitim-öğretim hayatım boyunca bana güvenerek her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni bugünlere kadar yetiştiren ve bana en büyük desteği veren çok sevgili annem Ayşegül ÇAVUŞ'a ve babam Ömer ÇAVUŞ'a

Sonsuz teşekkürler...

Derya ÇAVUŞ

Eylül, 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Fenolik Bileşikler	1
1.1.1. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması	2
1.1.1.1. Fenolik Asitler.....	2
1.1.1.2. Flavonoidler.....	3
1.1.2. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerden Ekstraksiyonu	6
1.1.2.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	7
1.1.2.2. Katı Faz Ekstraksiyonu	8
1.2. Fenolik Bileşiklerin Analizlerinde Kullanılan Yöntemler	11
1.2.1. Kromatografik Yöntemler	11
1.2.1.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	13
1.2.2. Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini	15
1.3. Thymus praecox Opiz subsp. caucasicus var. caucasicus	16
1.4. Amaç	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
2.1. Bitkilerin Toplanması.....	20
2.2. Anzer Çayından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimize Edilmesi.....	20
2.2.1. Anzer Çayının Çiçek Kısmından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	20
2.2.1.1. Örneklerin Kodlanması	22
2.2.2. Anzer Çayının Çiçek, Yaprak ve Dal Kısımlarından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	24
2.2.3. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV Analizleri	25
2.2.3.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller	25
2.2.3.2. Standartlar ve Kalibrasyon	26

2.2.3.3.	HPLC-UV Koşulları.....	26
2.2.3.4.	HPLC-UV için Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi	27
2.2.4.	HPLC-UV ile Bitkiden Fenolik Madde Ekstraksiyonun Optimizasyonu	27
2.2.5.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini	27
2.2.6.	Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayinine Göre Fenolik Madde Ekstraksiyonun Optimizasyonu.....	28
2.3.	Anzer Çayının Çiçek, Yaprak ve Dal Kısımlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ile Analizleri.....	28
3.	BULGULAR	29
3.1.	Anzer Çayından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimize Edilmesi.....	29
3.1.1.	Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-UV Metot Optimizasyonu	29
3.1.2.	Anzer Çayından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun HPLC-UV ile Optimize Edilmesi.....	31
3.1.3.	Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayinine Göre Fenolik Madde Ekstraksiyonun Optimizasyonu.....	41
3.2.	Anzer Çayının Çiçek, Yaprak ve Dal Kısımlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ile Analizleri.....	43
4.	TARTIŞMA.....	48
4.1.	Fenolik Bileşiklerin Anzer Çayından Ekstraksiyonunun Optimize Edilmesi.....	48
4.1.1.	Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-UV Metot Optimizasyonu	48
4.1.2.	Anzer Çayından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun HPLC-UV ile Optimize Edilmesi.....	48
4.1.3.	Fenolik Madde Ekstraksiyonun Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayinine Göre Optimizasyonu	51
4.2.	Anzer Çayının Çiçek, Yaprak ve Dal Kısımlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ile Analizleri.....	52
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	54
	KAYNAKLAR.....	55
	ÖZGEÇMİŞ.....	60

ÖZET

Bu çalışma kapsamında, yöresel adı Anzer çayı olan Lamiaceae familyasından *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisinin fenolik bileşikleri spektrofotometrik ve HPLC-UV yöntemleri ile analiz edildi. Başlangıçta bitkiden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonlarının optimizasyon çalışması yapıldı. Metanolik ekstraktlar pH=2 ve pH=7'de sulu çözeltiliye alındı ve paralel olarak asidik hidroliz işlemi uygulandıktan sonra sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve iki farklı katı faz ekstraksiyonu yapıldı. Nihai ekstraktlar, spektrofotometrik toplam fenolik madde ve HPLC-UV yöntemleri ile analiz edildi. Bu işlem yalnızca bitkinin çiçek kısmına uygulanıp yaprak ve dal kısmına uygulanmadı. Bulunan sonuçlar karşılaştırılarak asidik hidrolizin ardından sıvı-sıvı ekstraksiyonunun en uygun yöntem olduğu belirlendi. Bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımlarının fenolik bileşikleri de bu şekilde ekstrakte edilerek HPLC-UV ile analiz edildi. Tüm ekstraksiyonların geri kazanım değerleri, örneklere uygulanan işlemler aynı şekilde standart fenolik maddelere de uygulanarak hesaplandı.

HPLC-UV kromatogramlarının elüsyon profilleri ve ekstraksiyon işlemine göre değişen davranışlarından elde edilen ipuçları bitkinin başlıca fenolik bileşiminin, kafeik asit gibi sinamik asit türevleri ve kuersetin gibi flavonoid türevlerinden oluştuğunu gösterdi. HPLC-UV analizleri ayrıca bitkinin kafeik asit, rutin, kuersetin ve kamferol içerdiğini de gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, fenolik bileşikler, flavonoidler, HPLC-UV, Toplam Fenolik Madde Tayini

SUMMARY

Determination of Phenolic Compounds in The Extract of *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* by Chromatographic and Spectrophotometric Methods

In this study context, spectrophotometric and HPLC-UV analysis of the phenolic compounds of the plant of *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* from Lamiaceae family which is traditionally called Anzer tea was carried out. Optimization of extraction of phenolic compounds from the plant was performed at the beginning. Liquid-liquid extraction at pH=2 and pH=7 in aqueous solutions of methanol extracts and in the aqueous solution after acidic hydrolysis were performed. Two different solid phase extractions were also carried out on methanol extracts. Obtained extracts were analyzed by spectrophotometric and HPLC-UV methods. The extraction optimization was applied only for the flower part of the plant. The extraction method was determined as liquid-liquid extraction after acidic hydrolysis by the comparison of the results of spectrophotometric total phenolic content and HPLC-UV analysis. The phenolic compounds of flower, leaf and stem parts of the plant were extracted by this selected extraction method and analyzed by HPLC-UV as well. The recovery values of all extraction were determined by the extraction of standart phenolic compounds as parallel.

The clues obtained by the elusion profiles of the HPLC-UV chromatograms and the behavior depending on the extraction method showed that the major plant phenolic contents are the derivatives of cinnamic acid and the flavonoids mainly caffeic acid and quercetin respectively. According to HPLC-UV analysis, the plant consists of caffeic acid, rutin, quercetin and kaempferol as well.

Key Words: *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, phenolic compounds, HPLC-UV, Total phenolic content

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Flavonoid türleri için temsili bileşikler	4
Şekil 2. Apigenin-7- <i>O</i> - β -glikozit (Apigetrin)'in yapısı (flavon tip).....	5
Şekil 3. HPLC cihazının temel parçaları	14
Şekil 4. HPLC-UV cihazının şematik gösterimi	15
Şekil 5. Anzer çayının görünümü	17
Şekil 6. HPLC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm'de (b) 5 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar.....	30
Şekil 7. Hekzan ile başlayan çiçek ekstraksiyonunun HPLC-UV analizlerinin grafiksel sonuçları	35
Şekil 8. Metanol ile başlayan çiçek ekstraksiyonunun HPLC-UV analizlerinin grafiksel sonuçları	36
Şekil 9. Çiçek kısmının hekzan ve metanol ile başlayan hidrolizli ekstraktlarının 280 nm'de HPLC-UV kromatogramları.....	37
Şekil 10. Çiçek kısmının hekzan ve metanol ile başlayan pH=2'deki ekstraktlarının 280 nm'de HPLC-UV kromatogramları	37
Şekil 11. Çiçek kısmına ait metanol ile başlayan pH=2 ve pH=7'de elde edilen ekstraktların 280 nm'de HPLC-UV kromatogramları.....	38
Şekil 12. Çiçek kısmına ait metanol ile başlayan pH=2 ve hidroliz ile elde edilen ekstraktların 280 nm (a) ve 315 nm'de (b) HPLC-UV kromatogramları.....	39
Şekil 13. Çiçek kısmının metanol ile başlayan supelco (a) ve discovery (b) katı faz ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların HPLC-UV kromatogramları	40
Şekil 14. İki katı faz ekstraktları ile hidrolizli ekstraktın HPLC-UV kromatogramları	41
Şekil 15. Ekstraktların mg standart/g havada kuru madde cinsinden toplam fenolik madde tayini sonuçlarının hata çubukları ile birlikte grafiği	42
Şekil 16. Çiçek kısmının direkt ekstraktının 280 nm'de HPLC-UV kromatogramı	44
Şekil 17. Çiçek kısmının hidrolizli ekstraktının 280 nm (a) ve 315 nm'deki (b) HPLC-UV kromatogramı.....	45
Şekil 18. Yaprak kısmının hidrolizli ekstraktının 280 nm ve 315 nm'de HPLC-UV kromatogramı	46
Şekil 19. Dal kısmının hidrolizli ekstraktının 280 nm ve 315 nm'de HPLC-UV kromatogramı	47

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bazı fenolik asitlerin yapısal tipleri	3
Tablo 2. Örneklerin kodları, ekstraksiyon detayları ve mg kuru kalıntı/mL metanol cinsinden son ekstrakt konsantrasyonu	24
Tablo 3. Optimize edilen HPLC-UV metodunun parametreleri	31
Tablo 4. Hekzan ile başlayan çiçek ekstraksiyonlarına ait HPLC-UV ile ölçülen % geri kazanım değerleri	32
Tablo 5. Metanol ile başlayan çiçek ekstraksiyonlarına ait HPLC-UV ile ölçülen % geri kazanım değerleri	33
Tablo 6. HPLC-UV ile çiçek ekstraktlarının tüm ekstraksiyon koşullarında hekzan ile başlayan ekstraktlarının analiz sonuçları (mg/havada kuru madde).....	34
Tablo 7. HPLC-UV ile çiçek ekstraktlarının tüm ekstraksiyon koşullarında metanol ile başlayan ekstraktlarının analiz sonuçları (mg/havada kuru madde).....	35
Tablo 8. Ekstraktların mg standart/g havada kuru madde cinsinden toplam fenolik madde tayini sonuçları	42
Tablo 9. Fenolik madde standartlarının hidrolizli ekstraksiyonunun %'de geri kazanım değerleri	43
Tablo 10. Bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımlarına ait hidrolizli ve direkt ekstraktların HPLC-UV ile kantitatif analiz sonuçları.....	44

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AcOH	: Asetik asit
C18	: Oktadesil
C ₆ H ₅ O ⁻	: Fenolat anyonu
C8	: Oktil
CH ₃ CN, ACN	: Asetonitril
D	: Dağılma katsayısı
DAD	: Diyot serili dedektör
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC- UV	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviole Dedektör
HCl	: Hidroklorik asit
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
L	: Litre
LOD	: Tespit sınırı (limit of detection)
LOQ	: Tayin sınırı (limit of quantitation)
M	: Molarite
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
nL	: Nanolitre
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu (solid phase extraction)
UV	: Ultraviole
ark.	: arkadaşları

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Fenolik Bileşikler

Doğal bileşiklerin bir kısmı bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküller olup, sinyal (mesajcı) olarak ve mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar "ikincil bitki ürünleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitüe olmuş halleridir (Cordell ve ark., 2007).

Fenolik bileşikler altı üyeli aromatik halkaya (benzen) direkt bağlı bir hidroksil grubu (-OH) içeren aromatik bileşiklerdir. Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Fenoller pek çok bakımdan karbon zincirine bağlı hidroksil grubu içeren alifatik yapıların alkollerine benzerler ancak aromatik halkanın varlığından da etkilenirler. Aromatik halkaya bağlı fenolik hidroksillerin hidrojeninin kararsız olması ve bu yüzden hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli olmalarından dolayı zayıf asidiktirler. Fenolik yapıdan hidrojenin kopmasıyla oluşan fenolat anyonunun ($C_6H_5O^-$) sudaki çözünürlüğü hayli yüksektir (Vermerris ve Nicholson, 2006).

Fenolik bileşikler bitkilerin temel bileşenlerinden olup bitkilerin ve onlardan türetilen ürünlerinin besinsel ve organoleptik (renk, koku ve tat) özelliklerinde önemli rol oynarlar (Fabre ve ark., 2001; Borbalán ve ark., 2003; Fang ve ark., 2007). Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi bitkiye koku ve tat verirken bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır.

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve doku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları gibi birçok açıdan önem taşırlar (Çam ve ark., 2004).

1.1.1. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması

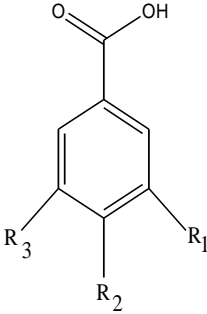
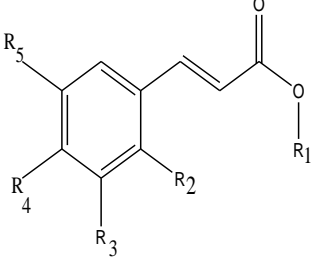
Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6000'den daha fazla fenolik yapının varlığı bilinmektedir (Bravo, 1998). Polifenoller, bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki grupta toplanabilir.

1.1.1.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, son yıllarda dikkati çeken maddelerin karmaşık bir grubudur, çünkü onların biyolojik özellikleri, özellikle onların ikincil bitki metabolizması için önemlidir (Beltrán, 2003). Fenolik asitler yaygın olarak bitki taç kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptir. Fenolik asitler Tablo 1'de gösterildiği gibi benzoik asit ya da sinamik asidin hidroksillenmiş türevleridirler (Balasundram, 2006). Özellikle kafeik asit ile onun esteri olan klorojenik asit ve ferulik asit gibi sinamik asit türevleri çok yaygındır. Klorojenik asit pek çok çeşit meyve, sebze ve kahvede bulunmaktadır (Spacil ve ark., 2008). Fenolik bileşiklerin bir alt sınıfı olan fenolik asitlerin ortak özelliği; karboksilli asit fonksiyonuna sahip olan fenol grubu içermeleridir (Robbins, 2003).

Kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit, meyvelerde dağılım gösteren en yaygın hidroksisinamik asitlerdir (Macheix ve ark., 1990). Genellikle çeşitli konjuge formlarında bulunan hidroksisinamik asitlerin serbest formları, kimyasal ya da enzimatik hidroliz ürünleridir. Konjuge formları şeker türevlerinin yanısıra kuinik, şikimik ve tartarik asit gibi hidroksiasitlerin esterleridir (Schuster ve Herrmann, 1985).

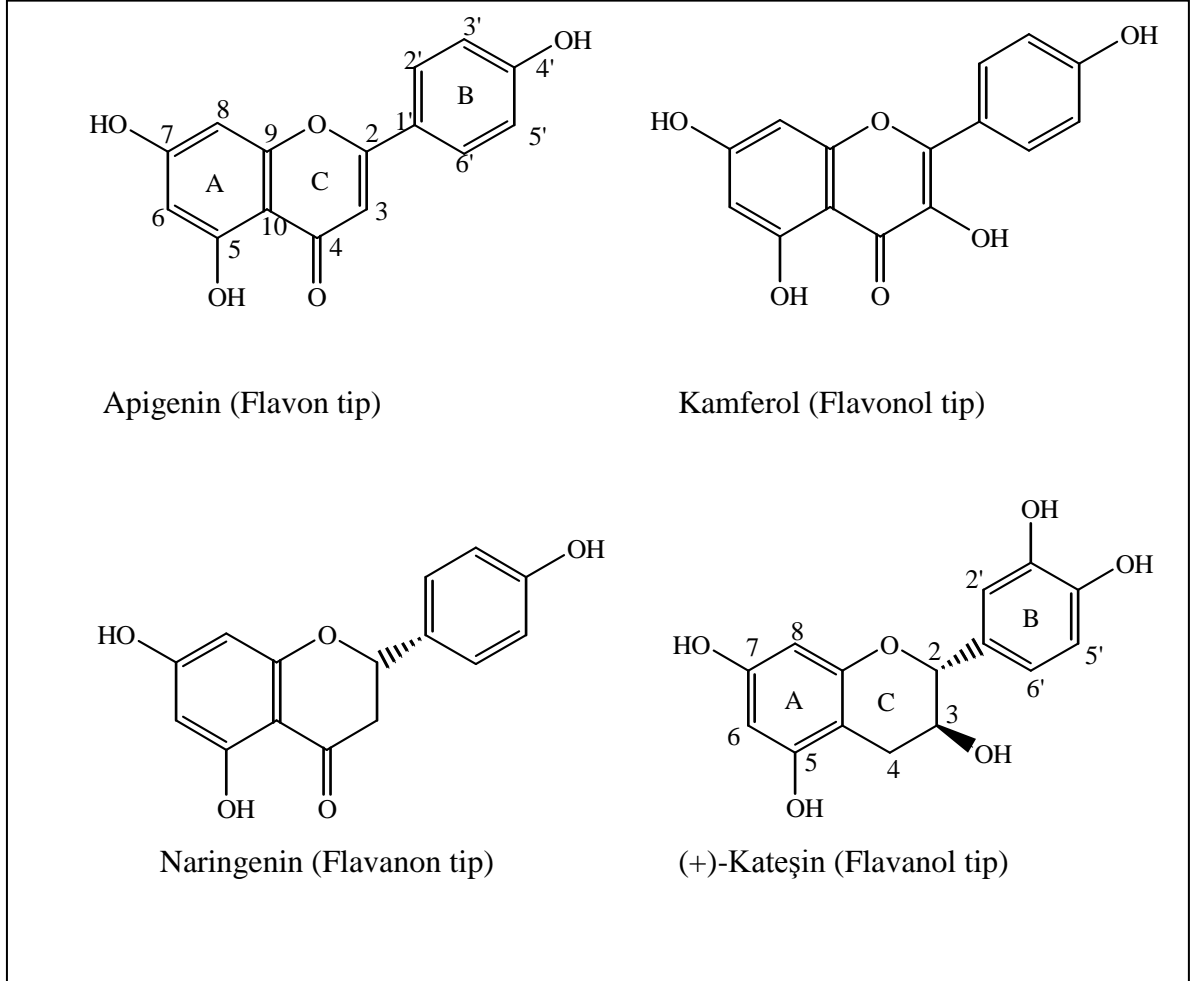
Tablo 1. Bazı fenolik asitlerin yapısal tipleri

Fenolik bileşik tipleri	Genel yapıları	Adları	R ₁	R ₂	R ₃			
Benzoik tip		Gallik asit	OH	OH	OH			
		Protokatekuik asit	OH	OH	H			
		<i>p</i> -OH Benzoik asit	H	OH	H			
		Vanilik asit	OCH ₃	OH	H			
		Siringik asit	OCH ₃	OH	OCH ₃			
Sinamik tip		Adları	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
		Sinamik asit	H	H	H	H	H	
		<i>p</i> -Kumarik asit	H	H	H	OH	H	
		<i>o</i> -Kumarik asit	H	OH	H	H	H	
		Klorojenik asit	kuinik asit	H	OH	OH	OH	H
		Kafeik asit	H	H	OH	OH	H	
		Ferulik asit	H	H	OCH ₃	OH	H	
		Sinapik asit	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	

1.1.1.2. Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, A, B, C halkasından ibaret difenilpropan (C6-C3-C6) yapısı oluşturur. Flavonoidler büyük düzlemsel moleküllerdir ve yapılarının çeşitliliği hidroksilasyon, metoksilasyon veya glikozilasyon gibi süstitüsyon modellerinden kaynaklanır. Flavonoid aglikonlar C-4 de bir karbonil grubu, C-3 de bir hidroksil grubu ve C-2 ve C-3 arasında doymuş bir tekli bağın bulunduğu ve bulunmadığı hallerinin kombinasyonlarına bağlı olarak flavon, flavonol, flavanon ve flavanol tipleri içinde alt gruplara ayrılırlar (Şekil 1). İzoflavonoidler C halkasının C-3 pozisyonuyla B halkasına

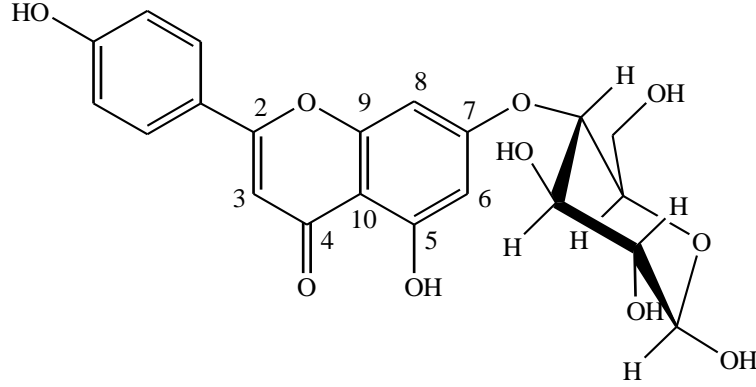
bağlı flavonoidlerdir. Tüm yapılar ana bileşik olan flavon (2-fenil benzopiron) ile ilişkilidir (Prasain ve ark., 2004).



Şekil 1. Flavonoid türleri için temsili bileşikler

Bazen aglikonları halinde mevcut olmalarına rağmen flavonoidler genellikle onların sudaki çözünürlüğünü artıran ve inaktif formda depolanmalarına müsaade eden glikozit formlarında bulunurlar ve *O*- ve *C*- olmak üzere iki glikozidik bağ tipi vardır (Cuyckens ve Claeys, 2004). *C*-Glikozilasyon bölgesi aglikonun C-6 veya C-8 pozisyonuyla sınırlıyken, *O*-glikozilasyon bölgesi genelde aglikonun fenolik hidroksil grubunda bulunur (Şekil 2) (Becchi ve Fraisse, 1989). Aglikonların bir ya da daha fazla hidroksil grupları asit-kararsız glukozidik O-C bağıyla oluşan bir şekere bağlıdır. Flavonoidlerde genellikle glikozillenen belli hidroksil grupları vardır. Bunlar flavonlar, flavanonlar ve izoflavonlarda 7-hidroksil grubu ve flavonoller ve flavanonlarda 3- ve 7-hidroksil gruplarıdır (Şekil 2). 5-

hidroksil grubu C-4 de bitişik karbonil grubuyla hidrojen bağına katıldığı için C-4 de karbonil gruplu bileşikler için 5-O-glikozitler nadirdir (Prasain ve ark., 2004).



Şekil 2. Apigenin-7-O-β-glikozit (Apigetrin)'in yapısı (flavon tip)

Flavonoidler en yüksek yapılı bitkilerden basit yapılı mantarlara kadar hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Sahip oldukları biyolojik etkinliklerinden dolayı bitkilerin sekonder metabolitleri arasında en önemli bileşik sınıflarından birisini oluştururlar.

Flavonoidler doğada bir milyar yıldan beri bulunmaktadırlar (Swain, 1975). Bu uzun zaman sürecinde bu bileşiklerin gelişen organizmalarla karşılıklı etkileşimde buldukları düşünülmektedir. Limon kabuğundan 1936 yılında elde edilen flavon bileşiklerinin, P-vitamini adı altında, kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması, flavonoidlere verilen önemi artırmıştır. Bu nedenle flavonoidlere karşı ilgi 1940'lardan itibaren artmaya başlamıştır (Ryzsnyak ve Szent-Georgy, 1936). 1970'li yıllarda flavonoidlerle yapılan çalışmaların boyutu daha da genişlemiş ve bu araştırmaların sonucu olarak bugün bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.

Bitkilerde rastlanan bu bileşikler, önceleri çiçeklerin sarı, kırmızı, turuncu, lacivert ve benzeri renklerinden sorumlu olan pigmentler olarak biliniyorlardı. Bu özelliğinden dolayı kuşlar ve böceklerin ilgisini çekerek bitkilerin tozlaşma ve tohum dağılımında etkilidir (Harborne, 1994). Flavonoidlere genellikle bitkilerin çiçek, yaprak, gövde, kök, kabuk, dal, meyve gibi tüm organlarında rastlanmaktadır.

Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi bazı önemli özelliklere sahiptirler (Harborne ve ark., 1975, Harborne ve

Mabry, 1982). Bunlardan başka flavonoidler, bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki ederler. Ayrıca solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunma fonksiyonlarına sahiptirler (Smith ve Banks, 1986).

Son yıllarda flavonoidlerin endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılması amacıyla yürütülen araştırmaların sayısı artmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidant özellikleri, çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri, metaller ile tepkimede bulunmalarından dolayı, besin, tekstil, deri, metalürji, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanılma olasılıkları artmaktadır. Bazı flavonoidler UV ışınlardan koruma özelliklerine sahip olmaları nedeni ile kozmetik ürünlerde, özellikle kremlerde önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Metal iyonları ile reaksiyon verme kapasitesine sahip olduklarından analitik amaçla uranyum, zirkonyum, titan ve diğer metallerin tayininde kullanılabilirler. Flavonoidlerin askorbik asitle birlikte et ve et ürünlerinin proteolizini hızlandırdığı açıklanmıştır. Bu nedenle flavonoidlerin et ve konserve endüstrisinde de kullanımı söz konusudur (Harmandar ve Bilaloglu, 1999).

1.1.2. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerden Ekstraksiyonu

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

Ekstraksiyonda kullanılacak çözücülerde olması gereken özellikler şöyle sıralanabilir:

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

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

Ekstraksiyon sırasında kullanılacak çözücü/katı oranı çalışılan hammaddeye, hammaddenin işleme hazırlanma tekniğine ve kullanılan ekstraktör tipine göre farklılık gösterir. Yüksek çözücü/katı oranı, daha fazla maddeyi çözmesine rağmen, son çözeltinin düşük derişimlerde elde edilmesine neden olur. Bu ise çözücü geri kazanımı sırasında daha çok çözücünün buharlaştırılmasını ve daha fazla enerji kullanılmasını gerektirir.

Sıcaklık arttıkça ekstraksiyon verimi genellikle artar. Sıcaklığın artışı, ekstrakte edilecek madde ve çözücünün viskozitesini azaltıcı etkisinin yanında çözünürlüğün artmasına neden olur. Herhangi bir ekstraksiyon ortam sıcaklığının, kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığına bağımlı bir üst sınırı bulunmaktadır. Çünkü ekstraksiyon ortamının sıcaklığı, çözücünün kaynama sıcaklığına yaklaştıkça çözücü buharlaşması artacağından ekstraksiyon için yararlı çözücü miktarı azalır. Bunun için uygulamada ekstraksiyon ortamının sıcaklığı kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığından 10–12°C daha düşük tutulur.

Ekstraksiyon süresi hammaddenin çözücü ile temas ettikleri süredir. Partikül içindeki çözücü ile dışındaki çözücü dengeye ulaşması için partikül ile her bir kademedeki çözücü arasındaki yeterli temas süresi sağlanmalıdır (List ve Schmidt, 2000; Kalender, 2002; Mc Cabe ve ark., 1993; Shing ve Rizvi, 1995; Wan ve Wakelyn, 1997).

Çözeltilerden ayrışması istenen madde veya grubun çözücü yardımı ile alınması sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı materyalden herhangi bir madde veya grubun uygun bir çözücü kullanılarak ayrılması ise katı-sıvı ya da katı faz ekstraksiyonu (*leaching*) olarak adlandırılır. Fenolik bileşiklerin bitkilerden ekstraksiyonu için hem sıvı-sıvı hem de katı faz ekstraksiyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.1.2.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, karışmayan iki sıvıda çözünen bir maddenin bu iki fazdaki konsantrasyonları oranının belli bir sıcaklıkta sabit olması şeklinde tanımlanan dağılma kanunu temeline dayanır. Sıvı faz içindeki bir madde bu maddeyi daha çok çözen ve ilk sıvı ile hiç karışmayan ikinci bir sıvı kullanılarak çekilir. Örneğin suda çözülmüş olan bir organik madde daha çok çözünebileceği ve su ile karışmayan eter ya da kloroform gibi organik sıvılarla ekstrakte edilir (Sarıkaya 1997).

Birbiri ile karışmayan çözücüler arasındaki dağılma dengelerine dayanan üç tip ayırma işlemi; basit ekstraksiyon, tam ekstraksiyon (sürekli ekstraksiyon) ve ters akım ekstraksiyonudur.

Basit ekstraksiyon, bir karışımdaki bir türün dağılma oranı makul ölçüde büyük (diğer türlerinkinin 5-10 veya daha fazla katı ise) ve diğer türlerin dağılma oranı oldukça küçük ($<0,001$) ise, ekstraksiyonla basit, hızlı ve kantitatif şekilde ayırma yapılabilir. Analit içeren çözelti, altı defa yeni çözücü ile ard arda ekstrakte edilir. Sıradan bir ayırma hunisi kullanılır, analiz tamamlandığında ayırma hunisinde ya ekstrakt ya da orijinal çözelti kalabilir (Uyan, 2007).

Tam ekstraksiyon (sürekli ekstraksiyon) ile bir karışımda dağılma oranı nisbeten küçük olan bir bileşeni ($D<1$) dağılma oranları sıfıra yaklaşan bileşenlerden ayırmak mümkün olur. Bu tip ekstraksiyonda organik çözücünün otomatik olarak damıtılmasını, yoğunlaşmasını ve sürekli olarak sulu tabakadan geçirilmesini sağlayan bir cihaz kullanılır. Böylece bu cihazla taze çözücü ile birkaç yüz ekstraksiyona eşdeğer bir ekstraksiyon bir saat veya daha az bir sürede fazla bir dikkat gerekmeden yapılabilir (Uyan, 2007).

Ters akım ekstraksiyonu, yüzlerce ard arda ekstraksiyonun yapılmasını sağlayan otomatik düzenekler geliştirildi. Bu aletlerle, fraksiyonlama ters akım prensibine göre olur. Burada bir seri farklı basamaklarda iki fazın taze kısımları arasında dağılma meydana gelir. Tam bir ekstraksiyonla, ters akım tekniği arasındaki fark, tam ekstraksiyonda sadece bir fazın taze kısımlarının kullanılıyor olmasıdır. Ters akım metodu ile dağılma oranları hemen hemen aynı olan bileşenlerin ayrılması mümkün olur. Örneğin; Craig on amino asidin, dağılma katsayıları arasındaki fark 0,1'den daha küçük olsa bile ters akım prensibi ile ayrılmasının mümkün olacağını göstermiştir (Uyan, 2007).

1.1.2.2. Katı Faz Ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonunda ise, ayrılması istenen maddenin belirli sıcaklık ve basınçta iki fazdaki denge derişimlerinin farklı olmasından yararlanır. Katı faz üzerinde tutulma yoluyla analitlerin çözeltiden saflaştırılması ve önderiştirme için örnek hazırlanması ve enstrümantal analizler için uygun bir çözücü ile analize hazırlanması yöntemidir. Sıvıdaki analitlerin katı fazda tutulması, daha sonra ortama ilave edilen bir çözücü ile katı fazdan analitlerin geri alınmasıdır. Ekstraksiyon için kullanılacak olan bitki, öğütülerek en uygun çözücü seçilmelidir (Farmakognazi II. Lab. El Kitabı, 1996). Katı faz ekstraksiyonunun iki tür kullanılma amacı vardır.

1. Eser miktarda bulunan bileşiklerin deriştirilmesi (zenginleştirme yöntemi).
2. Numunenin bulunduğu ortamın analize uygun hale getirilmesi.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda emülsiyon fazı oluşabilir ve bu ekstraksiyon verimini düşürür. Bu nedenden dolayı sıvı-sıvı ekstraksiyonu yerine katı faz ekstraksiyonu kullanılabilir.

Katı faz ekstraksiyonunda üç ayrı yöntem kullanılabilir;

1. Ters katı faz ekstraksiyonu: Apolar moleküller tutulur. Apolar etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleri ile tutunma gerçekleşir. Silikanın ucuna $C_{18}H_{37}$ bağlanmıştır ve bu aktif uç yardımıyla apolar moleküller tutulabilir. Ters katı faz sisteminde analitin bulunduğu sıvı faz polar, katı faz ise apolar olup dolgu materyali olarak kullanılır. Ters katı fazda kullanılan dolgu materyalleri; LC-18, ENVI-18, LC-8, ENVI-8, LC-4, LC-Ph ve Hisep'tir. Absorblanmış bileşiği ters katı faz ekstraksiyon tüpünden ayırmak için apolar çözücü kullanılır. Böylelikle adsorblayıcı yüzeyiyle bileşik arasındaki bağ koparılmış olur.

2. Normal katı faz ekstraksiyonu: Polar moleküller tutulur. Silikanın ucunda alümina, -CN gibi polar madde vardır. Tutunma dipol-dipol etkileşimi, dipol-indüklenmiş dipol etkileşimi veya hidrojen bağları ile gerçekleşir. Normal katı faz sisteminde analitin bulunduğu sıvı apolar, katı sabit faz ise polar karakterlidir. Polar analit, apolar matriks (aseton, hekzan, klorlu çözücü) ve polar sabit fazın ortasındadır. Polar fonksiyonel grup bağlı silikalar; LC-CN, LC-NH₂, LC-Diol, LC-S, LC-Florosil, ENVI-Florosil ve LC-Alümina'dır. Normal katı fazda; hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimi ve dipol-indüklenmiş dipol etkileşimleri görülür. Bu mekanizmalar tarafından adsorbe edilen bir bileşik, mekanizma bağlarını bozan bir polar çözücünün geçmesi ile ayrılır. Genellikle bu çözücü maddenin orijinal matriksinden daha polardır.

3. İyon değiştirme katı faz ekstraksiyonu: Katyon değiştirme ve anyon değiştirme mekanizması olmak üzere iki çeşit iyon değiştirme mekanizması vardır. Katyon tutuculara SCX, anyon tutuculara SAX adı verilir.

Katı faz ekstraksiyonu beş basamakta gerçekleşir;

- Uygun katı faz kartuşu seçilir.
- Şartlandırma (koşullandırma) basamağı: İlgilenilen bileşiğin tutulmasını sağlamak için örnek uygulanmadan önce absorbanın çözücüsü ile yıkanır. Bu aşamada, paketlenmiş materyalden (kartuş) çözücü baştan sona geçirilerek adsorbanın fonksiyonel gruplarının çözünmesini sağlar. Kolon içindeki hava uzaklaştırılır ve boşluklar çözücü ile doldurulur. Tipik hazırlama çözücüsü metanoldür. Ardından su veya sulu tampon çözeltisi kullanılır. Böylece kolon aktive edilir. Kolonun aktive edilmesi sulu örneklerin tutunma mekanizmalarının uygun çalışmasını sağlamak içindir.

•Alıkoyma basamağı: Numune sistemden geçirilir ve adsorban tarafından tutulur. Bu basamakta analiti içeren örnek kolona ilave edilir. Örnekler; yerçekimi, pompalama, vakum veya otomatik sistemlerle kolona yerleştirilir. En önemli mekanizma, örnek ilave edilirken kolon üzerinde analitin tutunmasıdır. Bu basamakta, analit adsorban üzerinde konsantre edilir.

•Yıkama (elüe etme) basamağı: Ortamda tutunan, istenmeyen bileşikler kolondan yıkama ile uzaklaştırılır.

•Çözerek alma basamağı: Katı fazda tutunan bileşik uygun bir çözücü ile elüe edilir. Uygun bir çözücü ile analitin adsorbandan ayrılması sağlanır. Uygun çözücü analiti iyi ayırmalı ve analit-adsorban etkileşimine sebep olmamalıdır (Kutlular, 2007).

Bu beş basamaklı yöntem katı faz ekstraksiyonunun temel mekanizmasıdır.

Katı faz ekstraksiyonu için kullanılan adsorbanlar; diskler, kartuşlar ve şıringalar olarak üç temel şekilde paketlenir. Diskler, 4-90 mm arasındaki farklı yarıçaplarda kullanılabilir. En popüler ekstraksiyon disklerinden biri empore ekstraksiyon diskidir. Bu disk politetrafloretillen fibrillerinden oluşan inert bir matriks içine yerleştirilir. Diskin en büyük avantajı büyük hacimli örnekler için yüksek akış oranı sağlayan geniş yüzey alanına sahip olmasıdır ve hızlı kütle transferidir. Kartuşlar, 100 mg - 1 g'a kadar küçük veya daha fazla oranlarda değişir. Şıringalar, 1-25 mL hacimli olup paket ağırlıkları 50 mg – 10 g arasındadır. Halen katı faz ekstraksiyonunda en çok kullanılan format şıringalardır.

Ekstraksiyon işleminin çok kısa sürede olması ve sistemin karmaşık olmaması bu yöntemin avantajlarından. Dezavantajı ise üretici firmaların kartuşları genellikle tek kullanımlık üretmelerinden dolayı maliyetinin biraz yüksek olmasıdır (Kutlular, 2007) .

Bitki örneklerinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu çoğunlukla seçici ekstraksiyon yöntemiyle yapılır. Bu yöntem ile fenolik bileşikler, bitki örneğinden farklı çözücülerle, polaritenin artış sırası ile ardarda ekstraksiyon yapılarak izole edilirler. Böyle bir ekstraksiyon yapılırken, bitki örneğini lipofil karakterli bileşiklerden (klorofil, karotenoidler, steroller, yağlar, vakslar vb.) arındırmak için önce petrol eteri veya hekzanla işlem yapılması gerekir. Daha sonra bitki kalıntısı artan polaritede çözücüler ile; dietil eter, etil asetat, etanol veya metanol ve bunların farklı konsantrasyonlarla sulu çözeltileri ile ardarda ekstrakte edilir. Başka bir yöntem ise şöyle açıklanabilir: Bitki örneği önce apolar çözücü ile muamele edilerek lipofil bileşiklerden arındırılır. Sonra ise, düşük molekül ağırlıklı alkolle (metanol veya etanol) veya bunların sulu çözeltileriyle birkaç kez ekstrakte edilir (Harmandar ve Bilaloglu, 1999).

1.2. Fenolik Bileşiklerin Analizlerinde Kullanılan Yöntemler

Fenolik bileşiklerin analizleri spektrofotometrik olarak toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanidin gibi sonuçları grup içindeki tek bir fenolik bileşen eşdeğeri cinsinden sunulan yöntemler ile yapıldığı gibi her bir bileşenin tespitine yönelik uygun dedektör kullanılarak kromatografik olarak da yapılmaktadır.

UV (Ultraviyole) ya da MS (kütle spektroskopisi) dedeksiyonuyla birlikte RP-LC (ters faz-sıvı kromatografisi) bitki ekstraktlarının fenolik bileşimleri için seçilen bir yöntemdir. Bitki materyalinin analizi yapılırken, her bir bileşiğin detaylı özelliği bilinse de, bileşikler çoğu zaman maksimum absorbanlara göre gruplanırlar; fenolik asit ve flavanoller (280 nm), flavonoller (260 veya 365 nm) ve antosiyaninler (520 nm) (Shi ve ark., 2002). Gıda fenolikleri çoğunlukla UV-Vis ve Diyot serili dedektörleri (DAD) ile belirlenir (Shahidi ve Naczki). DAD dedektörü ile bileşiğin tüm UV-Vis spektrumu alınır ve standart bileşiklerin spektrumuyla eşleştirilir, böylece pik tanımlanması daha güvenilir olmaktadır (Shi ve ark., 2002). Fenolikleri belirlemek için kullanılan diğer dedektörler elektrokimyasal kolorimetrik dedektörü, florimetrik dedektördür (Shahidi ve Naczki, 2003).

Fenollerin ayrılması genellikle metanol (MeOH) veya asetonitril (CH₃CN, ACN) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren sulu hareketli faz ile çalışan C18 kolonlarında gerçekleştirilir. Hareketli fazda fenolik asitlerin protonlaşmalarını garantilemek için formik asit (HCOOH), asetik asit (AcOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit (H₃PO₄) gibi asitler asidik modifiye ediciler olarak kullanılırlar ve böylece pik şekli ve çözünürlüğün gelişmesi sağlanır (Wu ve ark., 2004). MS iyon kaynağının bileşenlerine zarar verebileceği için MS dedeksiyon kullanılırken anorganik H₃PO₄'ün kullanımından kaçınılmalıdır. TFA pek çok elektrofilik flor grupları içerdiği için bunun eklenmesi durumunda da bir proton verici olarak hizmet eder ve iyon baskısına sebep olur (Wu ve ark., 2004).

Bu çalışmada, UV dedektör ile RP-LC'in kombinasyonu (HPLC-UV) *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitki ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu geliştirildi ve bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısmından optimize edilen ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlar HPLC-UV ile analiz edildi.

1.2.1. Kromatografik Yöntemler

İki veya daha fazla maddenin birbiri ile karışmayan iki faz arasında farklı oranlarda dağılma özelliğinden yararlanılarak ayrılması esasına dayanır. Daha açık bir tanım getirilirse, kromatografi; kompleks karışımlardaki çeşitli maddeleri birbirinden ayırmaya

ve tanımlamaya olanak veren bir seri ayırma tekniğidir. Kromatografik ayırmalar, biri sabit diğeri hareketli olan iki faz arasında gerçekleştirilir. Sabit faz bir kolon içerisine doldurulmuş veya düz bir zemin üzerine yayılmış herhangi bir katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Hareketli faz bir kolon içinde, ya normal yer çekimi kuvvetiyle veya basınçla kolondaki sabit faz üzerinden geçirilir. Bu geçiş esnasında hareketli fazda çözülmüş halde bulunan maddelerle sabit faz arasında fiziksel ve kimyasal bazı çekim kuvvetleri meydana gelir. Bu çekim kuvvetleri her madde için ayırdır. Bundan dolayı hareketli faz, sabit faz üzerinden geçerken, hareketli faz içerisinde bulunan maddelerin kolon içindeki hızları farklı olur. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en az olan kolon içinde hızlı yol alırken (kolonda en önce çıkarken), sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en çok olan, yavaş yol alır (Gündüz. 2002). Bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar (Skoog ve ark., 1998).

Kromatografik yöntemler farklı kriterlere göre sınıflandırılabilir. Bunlardan birinde, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettikleri esas alınır. Bu esasa göre kromatografi, kolon ve düzlemsel kromatografi olarak ikiye ayrılır. Kolon kromatografide, sabit faz ince bir kolon içerisine doldurulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit faz üzerinden geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kâğıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Düzlemsel kromatografi yöntemleri de, ince tabaka sıvı kromatografisi (TLC) ve elektroforez ile elektrokromatografiyi içermektedir. Kromatografik yöntemlerin bir başka sınıflandırması ayırma mekanizmasına göre yapılabilir. Bunlar;

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

Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması, kullanılan sabit ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır. Bunlar;

- Sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Süperkritik akışkanlı kromatografi

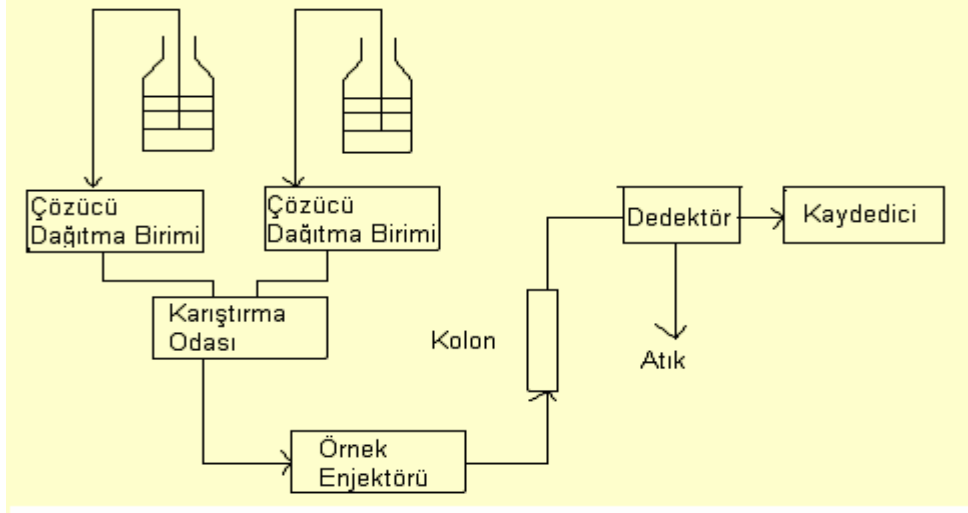
Bu isimlerde de geçtiği gibi, bu üç teknikte hareketli faz sırası ile sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sadece sıvı kromatografisi hem kolonlarla hem de düz yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir. Gaz kromatografisi ve süperkritik sıvı kromatografisi yalnızca kolonlarda gerçekleştirilir (Skoog ve ark., 1998). Bu çalışmada sadece HPLC kullanıldığı için detaylı olarak HPLC üzerinde durulacaktır.

1.2.1.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografik ayırma teknikleri arasında yaygın kullanım alanına sahip olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıvı fazda çözünebilen analitlerin kolon materyaline olan ilgilerine göre kolondan farklı sürelerde çıkma prensibine dayalı bir tekniktir. Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı, yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi önemlidir ve çözülmüş bileşenler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır. Sabit faz kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Çözülmüş bileşenler ile sabit ve hareketli fazlar arasında istenilen etkileşim, hareketli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Özellikle diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikler ve yüksek polarlıktaki bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir (Henden ve ark., 2001).

HPLC sistemi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Bu sistemin önemli bir bölümü ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir.



Şekil 3. HPLC cihazının temel parçaları

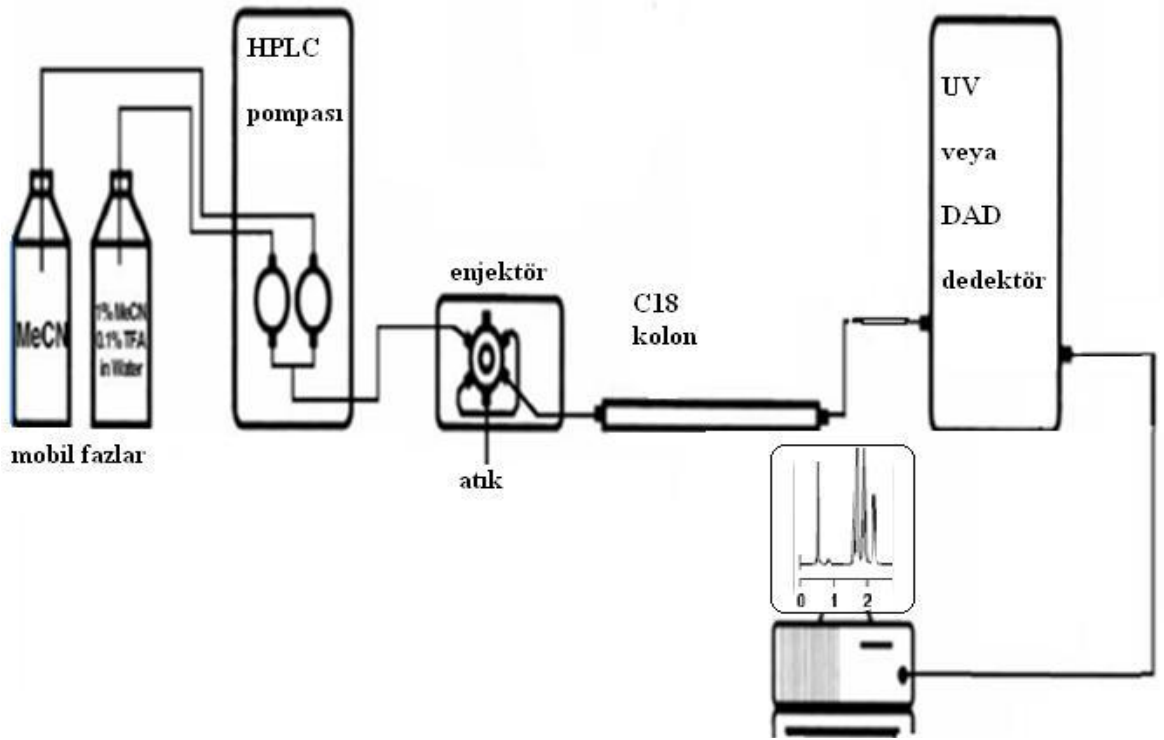
HPLC uygulamalarında hareketli faz ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde kullanılan hareketli fazların ortak özellikleri şunlardır; yüksek derecede saflık, dedektör ile uyumluluk, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olması, uygun fiyat.

Her bir HPLC türünde kullanılan hareketli fazların özel farklılıkları vardır. İyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde genellikle farklı pH değerlerine ayarlanmış sulu tampon çözeltileri hareketli faz olarak kullanılır. Normal-faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar çözücü karışımları hareketli faz olarak kullanılır. Boyut eleme kromatografisinde ise kullanılan çözücü, polimer örneğini çözebilmesi ama dolgu materyali ile kimyasal etkileşime girmemelidir. Doğru molekül ağırlığı tayininde bu çok önemlidir.

HPLC analizlerinde yaygın olarak UV dedektörler kullanılır. Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm'den 800 nm'ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltiden sürekli olarak ışın geçerken analitler tarafından ışının bir kısmı absorbe edilebilir (Harwey, 2000). Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır. Bunun sonucu olarak moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin kantitatif tayininde kullanılır. Absorpsiyon spektroskopisi:

1. Hem organik hem de inorganik sistemlere yaygın uygulanabilirlik,
2. 10^{-4} M'dan 10^{-5} M'a kadar değişen tipik duyarlılık değerleri,
3. Orta-derecede seçimlilik,
4. İyi bir doğruluk,
5. Veri toplama kolaylığı ve elverişliliği gibi özelliklerinden dolayı kantitatif analiz için elverişli olan en yararlı ve en yaygın kullanılan araçlardan biridir.

Bir ultraviole dedektörüne bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) cihazı şematik olarak Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. HPLC-UV cihazının şematik gösterimi

1.2.2. Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Fenolik bileşikler için birçok yöntem geliştirildi ve fenolik bileşiklerin analizi üzerine bir takım incelemeler yayınlandı. Bu yöntemler, toplam fenolik bileşen miktarının veya bir fenolik bileşiği veya grubu ölçmesine göre sınıflandırılmaktadır. Folin-Ciocalteu yöntemi toplam fenolik bileşiği belirlemek için kullanılır. (Shahidi ve Naczki, 2003).

Folin-Ciocalteu yöntemi genellikle gıda fenoliklerinin toplam kapasitesini belirlemede kullanılır. Folin-Ciocalteu reaktanı spesifik değildir, ekstrakte edilen

maddedeki tüm fenolik grupları ve ekstrakte edilen proteinler de dahil olmak üzere belirlemektedir (Kahköhen ve ark., 1999; Shahidi ve Nacz, 2003).

Yöntem, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımını içeren Folin-Ciocalteu reaktifine alkali ortamda fenolik hidroksil grubundan elektron transferi gerçekleşir ve indirgenmiş kompleksin oluşturduğu koyu mavi renk 760 nm’de maksimum absorbans oluşturur ki, rengin şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. (Slinkard ve Singleton, 1977; Vermerris ve Nicholson, 2006).

1.3. *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*

Thymus praecox Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisi Lamiaceae familyasına ait bir kekik türüdür. Bitkinin familya adı olan Lamiaceae, Türkçede Ballıbabagiller olarak kullanılmakta olup bitkinin yöresel adı ise Anzer çayıdır. Bitki, 15-20 cm arasında boylanabilen, küçük yapraklı, kuvvetli kokulu, yaz aylarında dalların tepe kısmında başak formunda pembe-erguvani-beyaz çiçekler açan, otsu yapıda çok yıllıklı bir türdür (Şekil 5).

Özellikle meyilli, kurak ve yamaç kısımlarda kümeler halinde yetişmektedir. Doğu Karadeniz Bölgesinin yüksek kesimlerinde yayılış gösteren bu bitki, Rize ili İkizdere ilçesi aşağı ve yukarı Anzer adı verilen ve denizden 2300-2500 m yükseklikteki yörede yoğun şekilde doğal olarak yetişmektedir. Haziran ayından itibaren yaklaşık iki ay boyunca farklı yüksekliklerde, çiçekli olarak bulunan Anzer çayı, arıların en çok ziyaret ettiği nektar bitkilerindedir. Yüzlerce yıldır yöre halkı tarafından bilinen ve doğadan toplanan Anzer çayı, kurutularak kış aylarında bitkisel çay şeklinde tüketilmektedir. Yörede Anzer çayının; soğuk algınlığı, gribal enfeksiyonlar, mide ve bağırsak rahatsızlıkları gibi birçok derde deva olduğuna inanılmaktadır (Yıldız, 2007). Ayrıca, timol ve karvakrolün düz kas spazmlarını çözerek, iç organlarda duyulan ağrıları yok ettiği hayvan deneyleri ile kanıtlanmıştır (Bal, 2001). Kekik, doğal temizleyici olarak ta kullanılır.

Artvin ilinde de yetişen bitki, Artvin ilinde nesli tehlike altında olan bitkiler arasında değerlendirilmiş ve tehlike boyutu olarak zarar görebilir olarak belirlenmiştir. Bu durum bitkinin yetiştiği alanın koruma altına alınması gerektiğine işaret etmektedir (Eminağaoğlu ve ark., 2010).



Şekil 5. Anzer çayının görünümü

1.4. Amaç

Ballibabagiller (Lamiaceae) familyasından olan *Thymus* cinsi, Türkiye’de 24 tanesi endemik olan (68 takson) 41 tür tarafından temsil edilmektedir (Bağcı ve Başer, 2005). Bu türün üyeleri Türkiye’de kekik olarak adlandırılmakta olup bitki çayı ve baharat olarak kullanılmaktadır.

Bitkinin özellikle kokusunun dikkat çekmesinden dolayı pek çok türünde diğer bir sekonder metabolit olan uçucu yağlar üzerine yapılan çalışmalar ile bu bileşiklerin antioksidan özellik gösterdikleri ortaya konulmuş ve GC-MS ile aydınlatılmışlardır. Örneğin; Tepe B. ve arkadaşları *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* ve *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* bitkilerinden clevenger aparatı ile subuharı destilasyonu yöntemini kullanarak elde ettikleri uçucu yağları GC-MS ile analiz etmişler ve DPPH radikal temizleme aktiviteleri ile β -karoten-linoleik asit yöntemini kullanarak antioksidan karakterlerini tayin etmişlerdir. Sökmen A. ve arkadaşları, endemik *Thymus spathulifolius* bitkisinin metanolik ekstraktları ve uçucu yağlarının antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini incelemiş ve uçucu yağlarını GC-MS ile aydınlatmışlardır.

Ancak bitkinin türlerinin fenolik madde içeriği bazı sistematikçilerin kemotaksonomik çalışmalarında hedeflenen bileşikler olmaları dışında nadiren çalışılmıştır. Örneğin Corticchiato M. ve arkadaşlarının yaptıkları kemotaksonomik bir çalışmada *Thymus herba barona* bitkisinin dietil eter ekstraktlarından eriodiktiol ve naringenin gibi flavanonlar ve luteolin, sorbifolin, timusin, cirsiliol, apigenin, sideritoflavon, cirsimaritin, cirsilineol, ksantomikrol, 8-metoksicirsilineol ve genkvanin gibi flavonlar izole edilip tanımlanmıştır. Blazquez M.A. ve arkadaşları ise *Thymus*

webbianus bitkisinden luteolin, apigenin, eriodiktiol, naringenin, luteolin-7-O-glukozit, apigenin-7-O-glukozit ve apigenin-6,8-di-C-glukozit olmak üzere 7 farklı flavonoid izole etmiş ve UV spektrum, TLC ve HPLC-DAD ile tanımlanmışlardır. Bu çalışmada protokatekuik, klorogenik, sirincik, p-kumarik ve 3,5-dikafeoilkuinik asit ise HPLC-DAD analizleri ile karakterize edilen diğer fenolik bileşiklerdir.

Bu türler arasında *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* Rize'nin Anzer yaylasında yetiştiği ve bu yaylanın meşhur balı olan Anzer balının içeriğini oluşturan çiçeklerden biri olduğu için Anzer çiçeği olarak adlandırılmaktadır. Anzer yaylası özellikle bu bölgede üretilen ve diğer ballardan daha fazla sağlık faydaları olduğuna inanılan Anzer balıyla Türkiye'de çok meşhurdur. Arıların buldukları ortamın florası balın içeriği açısından oldukça önemli bir faktördür (Mendes ve ark., 1998). Anzer balının sağlık açısından faydalarının onun 80-90 endemik tür içeren 500 farklı çiçeğe sahip floral orijiniyle alakalı olduğu düşünülmektedir (URL-1, 2009). *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* Anzer balının karakterini belirlediği düşünülen bitkilerden biridir. Bu bitki üzerine yapılan bir çalışmada Orhan I. ve arkadaşları, bitkinin kloroform, etil asetat, etanol ve sulu ekstraktlarında 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) radikali temizleme ve demir(III) iyonu indirgeme-antioksidan kuvvet (FRAP) yöntemlerini kullanarak antioksidan özelliklerini incelenmişlerdir. Bitkinin etil asetat ve etanol ekstraktları önemli derecede DPPH• radikali temizleme aktivitesi gösterirken, sulu ekstraktları yüksek demir iyon-şelat etkisi göstermiştir. Bu kapsamda bitkinin uçucu yağları da çalışılmış ve FRAP yöntemine göre yaprak ve çiçeklerinin uçucu yağları yüksek antioksidan kuvvet göstermiştir.

Bu tez çalışması kapsamında *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisinin çiçek kısmından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için yöntem geliştirilmesinin spektrofotometrik toplam fenolik madde ve HPLC-UV yöntemleri ile analiz edilerek gerçekleştirilmesi amaçlandı. Bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısmında geliştirilen yöntemlere göre fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu ve HPLC-UV analizleri ile fenolik bileşiminin belirlenmesi hedeflendi.

Bitki ekstraktlarında fenolik maddelerin aydınlatılması için seçilen yöntemin hassasiyeti ve güvenilirliği kadar ekstraksiyon etkinliği de önemlidir. Bu anlamda çalışmanın en önemli kısmını, fenolik bileşiklerin *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisinin çiçek kısmından ekstraksiyonunun optimizasyonu oluşturmaktadır. Bu amaçla seçilen bir seri ekstraksiyon yöntemi paralel olarak çiçek kısmına uygulandı ve

hesaplanan geri kazanımlarına göre en uygun yöntem ile ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini ile gallik asit ve kateşin cinsinden belirlenmesi ve fenolik bileşik standartları kullanılarak RP-HPLC-UV yöntemi ile kantitatif analizleri hedeflendi. Bu tez, Anzer çayının ikincil metabolitlerden olan fenolik bileşikler açısından iyi bir kaynak olup olmadığının ortaya konulmasının yanısıra literatüre bu yöntemlerin karşılaştırmalı olarak uygulandığı bir çalışma olarak katkı sağlayacaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Toplanması

Deneyleerde kullanılan Anzer çayı, Temmuz 2010'da Anzer yaylasından 2300 m'den toplanarak güneş almayacak şekilde ve açık havada (yaylada) kurutuldu. Yaprak, sap ve çiçek olarak üç ayrı kısma ayrılarak blenderdan geçirilip ekstraksiyon verimini artırmak için yüzey alanının genişletilmesi amacıyla kahve öğütme makinesinde partükül boyutları küçültüldü. Kurutulan bitki örnekleri analizleri yapıłana kadar uygun şartlarda muhafaza edildi. Bitki örnekleri etüvde 100°C'de kurutularak çiçek,yaprak ve dal % nem değerleri sırası ile 8,9-7,3-19,3 bulundu.

2.2. Anzer Çayıdan Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimize Edilmesi

Fenolik bileşiklerin bitkiden ekstraksiyonundan önce bu bileşiklerin bitkiden en yüksek geri kazanım ile elde edilebileceği yöntem, bir seri deneme sonucu belirlendi. Bitkiler genel olarak en fazla çiçek kısımlarında fenolik madde içerdiklerinden dolayı bu yöntemler bitkinin çiçek kısmında uygulandı. Ekstraksiyon spike olarak adlandırılan yönteme göre numunelere belli miktarda standart maddelerin eklenmesi koşuluyla standartların numune matriksinden geri kazanımlarının hesaplanması şeklinde takip edildi. HPLC-UV analizlerinden elde edilen değerler sonucunda geri kazanımlar her bir standart için hesaplandı. Aynı işlemler spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini ile de yapıldı.

2.2.1. Anzer Çayının Çiçek Kısmından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Anzer çayında ekstraksiyonun optimize edilmesi için fenolik asitlerin genel olarak bitkilerde en bol buldukları çiçek kısmı seçilmiş ve bir seri farklı ekstraksiyon yöntemleri paralel olarak uygulandı. Ekstraksiyon çeşitleri öncelikle çiçek kısmında çok geniş bir yelpazede çalışıldıktan sonra mevcut analiz yöntemine göre bitki için uygun olduğu düşünülen ekstraksiyon yöntemi ile bitkinin çiçek kısmı dahil tüm kısımlarından fenolik bileşenler ekstrakte edildi.

Ekstraksiyon işlemleri her defasında homojen edilmiş toz halindeki örnekten 0,2500 g'ın hassas olarak tartılıp kapaklı 10 mL'lik reaksiyon tüplerine alınmaları suretiyle başlatıldı. Ekstraksiyonun geri kazanım takibinin yapılabilmesi amacı ile gallik asit,

protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, kateşin, vanilik asit, klorojenik asit, kafeik asit, siringik asit, p-kumarik asit, epikateşin, rutin ve kuersetin olarak 12 fenolik standart sonuçta 10 mg/L olacak şekilde kontrol grubu metanolik ekstraktlara ilave edildi. Ekstraksiyonlar, 2 saat süreyle 60-65°C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda bekletildi. Ekstraksiyon işlemleri;

- Hekzan ile başlayan ekstraksiyon,
- Metanol ile başlayan ekstraksiyon olarak başlıca iki ana gruba ayrıldı.

Burada hekzan çözücüsünün kullanım amacı polar olmayan bileşik gruplarının daha ilk aşamada uzaklaştırılmasıdır. Dolayısıyla asıl ekstraksiyon bu ilk arındırma aşaması takibinde %100 metanol çözücüsü ile devam etmektedir.

Hekzan çözücüsünün 3 mL'si ile başlayan ekstraksiyon 2 saat süreyle 25°C'de ultrasonik su banyosunda gerçekleştirildi ve takiben 15 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım (sıvı ekstrakt) mikropipet ile yeni tüpe aktarıldı ve üzerine 2 mL hekzan eklenerek karıştırılıp 1 dakika kuvvetli karıştırıldı. 15 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi. Tekrar üst kısmı ilk hekzan kısmına eklendi. Geri kalan katı kısma 5 mL metanol eklenerek, 2 saat 60°C'de ultrasonik su banyosunda bekletildi. 15 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi. Berrak kısım ayrı bir balona alınarak geri kalan katı kısım 2 kez 5 mL 60°C'ye ısıtılmış metanol çözeltisi eklenerek 10 dakika boyunca 60°C'de ultrasonik su banyosunda bekletilerek her defasında 15 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi ve berrak kısımlar birleştirildi. Sonuç olarak her bir ana grup takip edilerek elde edilen metanol ekstraktlarının çözücüsü buharlaştırılarak kurutuldu. Sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonu uygulanacağı sulu çözelti ortamının asitliğine bağlı olarak;

- Nötr pH: Katı kısmın ultra saf suya alınması,
- pH= 2: Katı kısmın pH=2'ye ayarlanmış sulu çözeltiliye alınması ve
- Asidik hidroliz: Katı kısmın metanolik 2 M HCl ortamında 100°C'de 2 saat boyunca gerçekleştirilen asidik hidrolize tabi tutulması ve çözeltinin soğutulması işlemlerinin ardından her üç ekstraksiyonda da aynı şekilde ardışık olarak 3 defa 3'er mL dietil eter ve 4 defa 3'er mL etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen organik kısımlar birleştirilerek çözücülerini uçuruldu ve 2,5 mL metanol ile çözümlenerek buzdolabında 4°C'de saklandı.

Çözücü olarak hekzan ve metanol ile başlayan ekstraksiyonu takiben iki farklı katı faz kartuşu kullanılarak katı faz ekstraksiyonları da standart eklenen ve eklenmeyen paralelleri şeklinde çalışıldı. Bunun için çözücüsü uçurulan ekstrakt seçilen katı faz

ekstraksiyonunda uygun sulu çözeltilerde çözülüp çözünmeyen kısımlar HPLC şırınga filtresinden geçirilerek süzüldü ve aşağıda anlatıldığı şekilde kartuşa yüklendi. Katı faz ekstraksiyonu için seçilen iki çeşit katı faz kartuşu;

1. Supelco LC-SAX SPE anyon-değişim fonksiyonlu quaterner amin gruplarıyla modifiye 100 mg katı faz içeren kartuşlardır.

2. Discovery DPA-6S (Supelco, Germany) amid gruplarıyla modifiye edilen silika uçlara sahip ters faz fonksiyonlu 500 mg katı faz içeren kartuşlarda ekstraksiyon şu şekilde gerçekleştirildi:

1. Supelco LC-SAX için;

Koşullandırma, 5 mL MeOH + 10 mL su ile yapıldı. Numune pH=7-8 olan ultra saf suyun 10 mL'sinde çözülerek 0,2 µm'lik HPLC şırınga filtresinden süzüldü. Kartuşa numune yüklenerek çözücüsü vakum altında tamamen uzaklaştırıldı. Elüsyon, 15 mL 90 mL Metanol: 10 mL 1 M Asetik asit olacak şekilde hazırlanan çözelti ile yapıldı. Elde edilen ekstraktların çözücüsü evaporatör ile uçurularak 2,5 mL meOH ile çözülerek buzdolabında 4°C'de saklandı (Nardini, 2005).

2. Discovery DPA-6S için;

Koşullandırma, 5 mL MeOH + 10mL su ile yapıldı. Numune pH=1,5 olan HCl çözeltilisinin 10 mL'sinde çözülerek 0,2 µm'lik HPLC şırınga filtresinden süzüldü. Kartuşa numune yüklenerek çözücüsü vakum altında tamamen uzaklaştırıldı. Elüsyon, 12 mL aseton ile yapıldı. Elde edilen asetonlu ekstraktların çözücüsü evaporatör ile uçurularak 2,5 mL MeOH ile çözülerek buzdolabında 4°C'de saklandı (Dvorakova ve ark, 2007).

Yukarıda belirtilen ekstraksiyon gruplarının her birinin fenolik standartlar ile geri kazanımlarının takip edilmesi amacıyla paralel olarak 10 mg/L fenolik standart karışımı içeren paralel ekstraksiyonları da gerçekleştirildi.

Tüm ekstraksiyon işlemleri 3 paralel halinde gerçekleştirildi.

Numuneler HPLC'den önce %50 metanol/su olacak şekilde 1/10 oranında seyreltikten sonra iç standart olan propil parabenden 10 mg/L olacak şekilde ilave edilip 0,2 µm'lik porlara sahip şırınga filtrelerinden süzüldü.

2.2.1.1. Örneklerin Kodlanması

Çalışmada *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisinden elde edilen ekstraktları deneylere başlanan çözücü, ekstraksiyon koşulları bilgisini içerecek şekilde kısaca kodlandı. Örneğin, hekzan ile başlayan ve hidroliz sonucunda elde edilen

ekstraktının kodu H-H; ilk harf hekzan ile başladığının, ikinci harf ise hidroliz olduğunun ifadesidir. Bu durumda pH=2'deki ekstraktı H-2; pH=7'deki ekstraktı H-7; direkt metanol ile çözünüp alınan ekstraktı ise H-D olarak kodlandı. Katı-faz ekstraksiyonu olan numunelerde ise kodlama SPE-1 ve SPE-2 olarak kullanıldı. SPE-1, Supelco LC-SAX SPE anyon-değişim fonksiyonlu quaterner amin gruplarıyla modifiye 100 mg katı faz içeren kartuşlardır. SPE-2, Discovery DPA-6S (Supelco, Germany) amid gruplarıyla modifiye edilen silika uçlara sahip ters faz fonksiyonlu 500 mg katı faz içeren kartuşlardır. Yine ilk harf, başlangıçta kullanılan çözücüye ait, ikinci kısım katı-faz ekstraksiyonu olduğunu ifade eder. Örneğin H-SPE-1; ilk harf hekzan ile başladığının, ikinci kısım ise katı-fazı belirtti. Çözücü olarak metanol kullanıldığında, kodlamanın ilk harfi M olur. Örneğin M-H; ilk harf metanol ile başladığının, ikinci harf ise hidroliz olduğunun ifadesidir. Standart ile başlanan çalışmalarda ise kodlamanın ilk harfi S olur. Örneğin S-2; ilk harf standart ile başladığının, ikinci sayı ise pH=2'de olduğunu belirtir. Çiçek, dal ve yaprak kısmında yapılan çalışmalarda, kullanılan kodlamada ise birinci harf kullanılan bitki kısmının ilk harfi, ikinci harf ekstraksiyon koşulları bilgisini içerir. Örneğin çiçeğin direkt metanol ile çözünüp alınması sonucunda elde edilen ekstraktının kodu C-D; yaprağın hidroliz sonucunda elde edilen ekstraktının kodu ise Y-H. Sadece standart karışımında yapılan çalışmalarda birinci kısım standart olduğunu (Std), ikinci kısım hidroliz kullanıldığını ifade eder Std-H.

Tablo 2. Örneklerin kodları, ekstraksiyon detayları ve mg kuru kalıntı/mL metanol cinsinden son ekstrakt konsantrasyonu

Tanımlama	Kod	İşlem	Ekstrakt konsantrasyonu (mg/mL)
Hekzan ile başlayan çalışmalar	H-H	Hidroliz	7,173
	H-2	pH=2	11,307
	H-7	pH=7	5,333
	H-D	Direkt	17,520
	H-SPE-1	Katı-faz	2,985
	H-SPE-2	Katı-faz	3,437
Metanol ile başlayan çalışmalar	M-H	Hidroliz	10,613
	M-2	pH=2	14,120
	M-7	pH=7	5,880
	M-D	Direkt	23,667
	M-SPE-1	Katı-faz	3,853
	M-SPE-2	Katı-faz	4,961
Standart ekleme (spike) ile geri kazanım çalışması	S-H	Hidroliz	13,680
	S-2	pH=2	19,413
	S-7	pH=7	10,547
	S-D	Direkt	18,133
	S-SPE-1	Katı-faz	7,964
	S-SPE-2	Katı-faz	8,376
Metanol ile başlanan çalışmalar	C-D	Direkt	11,36
	C-H	Hidroliz	22,24
	D-D	Direkt	5
	D-H	Hidroliz	13,32
	Y-D	Direk	9,6
	Y-H	Hidroliz	18,92
Standart karışımında geri kazanım çalışması	Std-H	Hidroliz	0,253

2.2.2. Anzer Çayının Çiçek, Yaprak ve Dal Kısımlarından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Çalışma bitkinin yaprak ve dal kısımlarına ait ekstraktlar direkt metanolik ekstraksiyonunda paralel olarak uygulandığı ve analiz edildiği hidrolizli ekstraksiyon ile devam etti. Bu kısımda da bitkinin çiçek kısmı karşılaştırmanın doğruluğu açısından aynı zamanda ve aynı şekilde ekstrakte edilerek HPLC-UV ile analiz edildi.

Bitkinin çiçek, yaprak ve dal olmak üzere her bir kısmında direkt metanolik ekstraksiyon ve asidik hidrolizi takiben sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandı. Bunun için yukarıda belirtildiği gibi tartılıp alınan örneğe 5 mL metanol eklenerek, 2 saat 60°C’de ultrasonik su banyosunda bekletildi. 15 dakika 4500 rpm’de santrifüj edildi. Berrak kısım ayrı bir balona alınarak geri kalan katı kısım 2 kez 5 mL 60°C’ye ısıtılmış metanol çözeltisi eklenerek 10 dakika boyunca 60°C’de ultrasonik su banyosunda bekletilerek her defasında 15 dakika 4500 rpm’de santrifüj edildi ve berrak kısımlar birleştirildi. Sonuç olarak her bir ana grup takip edilerek elde edilen metanolik ekstraktlar buharlaştırılarak kurutuldu. Katı kısmın metanolik 2 M HCl ortamında 100°C’de 2 saat boyunca gerçekleştirilen asidik hidrolize tabi tutulması ve çözeltinin soğutulması işlemlerinin ardından ardışık olarak 3 defa 3’er mL dietil eter ve 4 defa 3’er mL etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen organik kısımlar birleştirilerek çözücüleri uçuruldu ve 2,5 mL metanol ile çözülerek buzdolabında 4°C’de saklandı.

Asidik hidrolizin fenolik bileşenler üzerinde etkisinin incelenmesi için 10 mg/L konsantrasyonda 2,5 mL 13 fenolik standart karışımı (gallik asit, protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, kateşin, vanilik asit, klorojenik asit, kafeik asit, siringik asit, p-kumarik asit, epikateşin, rutin, kuersetin ve kamferol) yukarıda anlatıldığı gibi ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyonun ardından diğer ekstraktları ile aynı şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandı. Elde edilen ekstraktları çiçek kısmında olduğu gibi HPLC-UV analizlerine hazırlandı.

2.2.3. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV Analizleri

2.2.3.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller

Analitik saflık derecesinde fenolik standartlardan gallik asit, p-OH benzoik asit, protokatekuik asit, kateşin, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, siringik asit, epikateşin, kamferol, rutin ve iç standart propil paraben Sigma-Aldrich’den, kuersetin Fluka’dan, numune hazırlamada ve kromatografik analizde kullanılan HPLC saflıkta asetonitril, metanol, etil asetat, hekzan, eter, asetik asit ve hidroliz deneyleri için kullanılan HCl (hidroklorik asit) ve toplam fenolik madde tayinlerinde reaktif olarak kullanılan Folin-ciocalteau Merck’den satın alındı. HPLC şırınga filtreleri (RC-membrane, 0,2 µm) Filtre Sartorius Minisart RC 15, Sartorius (Almanya)’dan satın alındı. Spektrofotometrik analizler için Molecular Devices UV-Vis spektrofotometre kullanıldı.

Bu çalışmada, kimyasal madde ve bitki örneklerini tartmak için And GR200 analitik terazi, ekstraksiyon işlemleri ve kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Wise Clean ultrasonik su banyosu, çöktürme işlemi için Thermo Scientific Heroeus multifuge 3SR+ santrifüj, kurutma işlemleri için Oven etüv, çözeltileri karıştırmak için Velp Scientifica vorteks, ultra saf su temini için Human Corporation su sistemi kullanıldı. Ekstraksiyon sonrası çözücüyü uzaklaştırmak amacıyla Heidholph laborota 4000 marka evaporatör kullanıldı.

2.2.3.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Çalışmada kullanılacak stok standart çözeltileri için 13 standart fenolik bileşiklerden flavonoid olan kateşin, epikateşin, kuersetin, kamferol ve rutin %100 metanol, fenolik asitler olarak gallik asit, *p*-OH benzoik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, siringik asit ve iç standart propil paraben %50 metanol/sulu olarak 1000 mg/L konsantrasyonda hazırlandı. Bu stok çözeltilerden %50 metanol/su olacak şekilde seyreltme yoluyla 13 standardın 1, 2, 5, 10, 20 ve 30 mg/L'lik kalibrasyon örnekleri hazırlandı. İç standart olan propil parabenin stok çözeltisinden her bir kalibrasyon çözeltisine, son konsantrasyonu 10 mg/L olacak şekilde eklendi. Klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, rutin, kuersetin ve kamferol haricinde iç standart propil paraben gibi 280 nm'de maksimum absorbans veren her bir standardın konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanı iç standardın pik alanına bölünerek elde edilen oranlar kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, rutin, kuersetin ve kamferol için konsantrasyonlarına karşı 315 nm'de elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri hazırlandı.

2.2.3.3. HPLC-UV Koşulları

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı ve otomatik örnekleyicili Thermo Finnigan Surveyor HPLC-UV sisteminde yapıldı. Enstrüman chromQuest programı ile kontrol edildi. Tüm analizler için bir ters faz C18 kolon (150 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm partikül; Fortis) kullanıldı. HPLC-UV analizleri için kullanılan gradient elüsyonu 13 fenolik standardın uygun çözünürlükte ayrılmasını sağlayacak şekilde De Villiers ve arkadaşlarının (2004) kullandıkları yöntemden modifiye edildi. Hareketli faz (A) %2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) 70:30 asetonitril/su çözeltilerinden oluşmakta. Yüksek polarite ve düşük pH'dan düşük polarite ve yüksek

pH'ya doğru gradient elüsyon çalışıldı. Enjeksiyon hacmi 25 µL ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30°C'ye ayarlandı. Akış hızı 1,2 mL/dk olarak ayarlandı, dedektör 280 ve 315 nm'de çalıştırıldı.

2.2.3.4. HPLC-UV için Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi

EPA metoduna göre dedeksiyon limiti hesaplandı (US EPA, 1984). Tüm 13 standardın 5 mg/L'lik karışımı HPLC-UV ile analiz edildi. Her bir analitin sinyalinin gürültüye oranına (S/N) dayanan değer belirlendi ve 3 seviyesinde bir S/N sağlamak için gerekli konsantrasyon hesaplandı. Sonuç olarak, 0,5 mg/L'de gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, *p*-kumarik asit, rutin ve propil paraben, 1 mg/L'de kamferol, 2 mg/L'de kateşin, epikateşin ve kuersetin içeren çözelti hazırlandı ve 7 kez HPLC ile analiz edildi. Ardından her bir bileşik için tespit sınırı (LOD) pik yüksekliklerinin standart sapmalarının 3 katı olarak ve yüzde bağıl standart sapması (%BSS), pik alanı ve alıkonma zamanlarından hesaplandı. Kantitatif (nicel) olarak analitlerin belirlenme sınırı (LOQ) ise yine pik yüksekliklerinin standart sapmalarının 10 katı olarak hesaplandı.

2.2.4. HPLC-UV ile Bitkiden Fenolik Madde Ekstraksiyonun Optimizasyonu

Sonuçlar spike yöntemine göre numunenin standart eklenen ve eklenmeyen ekstraktlarının karşılaştırılması ile aşağıdaki formüle göre hesaplandı (EMIT, 2011).

$$\% \text{ Geri Kazanım (GK)} = (C_{\text{gözlenen}} - C_{\text{matriks}}) / C_{\text{spike}} \times \% 100 \quad (1)$$

Formülde geçen $C_{\text{gözlenen}}$, standart eklenmiş olan ekstraktta standardın HPLC-UV ile ölçülen mg/L cinsinden konsantrasyon değeri, C_{matriks} , standart eklenmemiş ekstraktta standardın HPLC-UV ile ölçülen mg/L cinsinden konsantrasyon değeri ve C_{spike} , eklenen standardın HPLC-UV' ye verildiği son konsantrasyonudur ki bu değer ölçülmez, bilinen konsantrasyon formülde kullanılır.

Yalnızca standart karışımına uygulanan ekstraksiyonun verimi, başlangıçta alınan konsantrasyonuna, ekstraksiyon işleminden sonra HPLC-UV ile ölçülen konsantrasyonunun yüzde oranı olarak hesaplandı.

2.2.5. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik madde tayini gallik asit ve kateşin standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiklerine göre değerlendirildi (Slinkard

ve Singleton, 1977). Yönteme göre 20 µL çeşitli konsantrasyonlarda (0,5; 0,35; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/mL) gallik asit veya kateşin standardı, 400 µL 0,5 N Folin-Ciocalteu reaktifi ve 680 µL ultra saf su ilave edilerek kuvvetli karıştırıldı ve 3 dakika bekletildi. Karışıma 400 µL Na₂CO₃ (10%) eklenerek kuvvetli karıştırılıp 2 saat oda koşullarında bekletildi. Bekletmenin ardından 700 nm'de absorbansları ölçüldü ve kalibrasyon grafikleri çizildi. Aynı işlemler 1 mg/mL 20 µL metanol ekstraktlarına da uygulandı ve absorbans değerleri ile gallik asit ve kateşin kalibrasyon grafikleri kullanılarak toplam fenolik madde içerikleri gallik asit yada kateşin eşdeğeri olarak mg gallik asit/g havada kuru madde veya mg kateşin/g havada kuru madde cinsinden hesaplandı. Tüm numunelerin analizleri 3 tekrarlı olarak yapıldı.

2.2.6. Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayinine Göre Fenolik Madde Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

Her bir ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde sonuçları karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde tayininin kaba bir yöntem olması ve tüm fenolik maddelerin matriks ortamında birlikte dedekte edildikleri bir spektrofotometrik tayin olması sebebiyle spike yöntemi ile HPLC-UV için uygulanan formüle dayalı bir karşılaştırma yapılması mümkün olmadığından karşılaştırmalar mg gallik asit/g havada kuru madde ve mg kateşin/g havada kuru madde cinsinden sonuçlarına göre yapıldı.

2.3. Anzer Çayının Çiçek, Yaprak ve Dal Kısımlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ile Analizleri

Bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımlarının ekstraktlarının geri kazanımları, paralel olarak aynı zamanda standart fenolik bileşiklerin aynı şekilde hidrolize tabi tutularak elde edilen ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları ile hesaplandı. Burada spike yöntemindeki gibi standartlar bitki matriks ortamına ilave edilmeden saf hallerinin bir karışımı olarak ekstraksiyona tabi tutuldu. % Geri kazanım hesaplaması ise elde edilen ekstraktların HPLC-UV ile ölçülen miktarlarının, standartların başlangıçta alınan konsantrasyonlarına yüzde oranı olarak gerçekleştirildi.

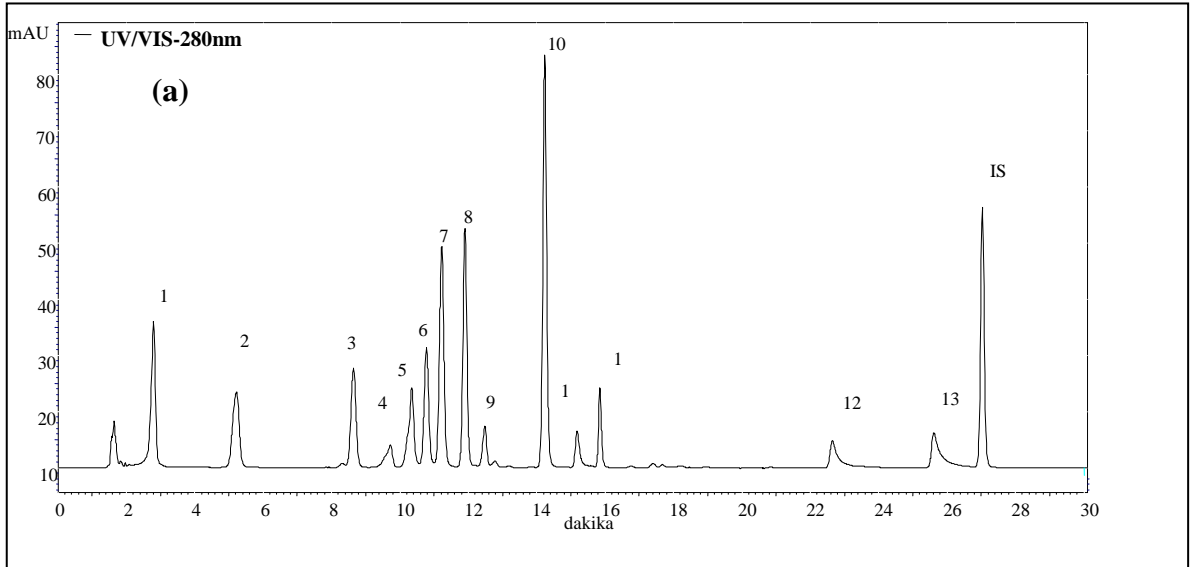
3. BULGULAR

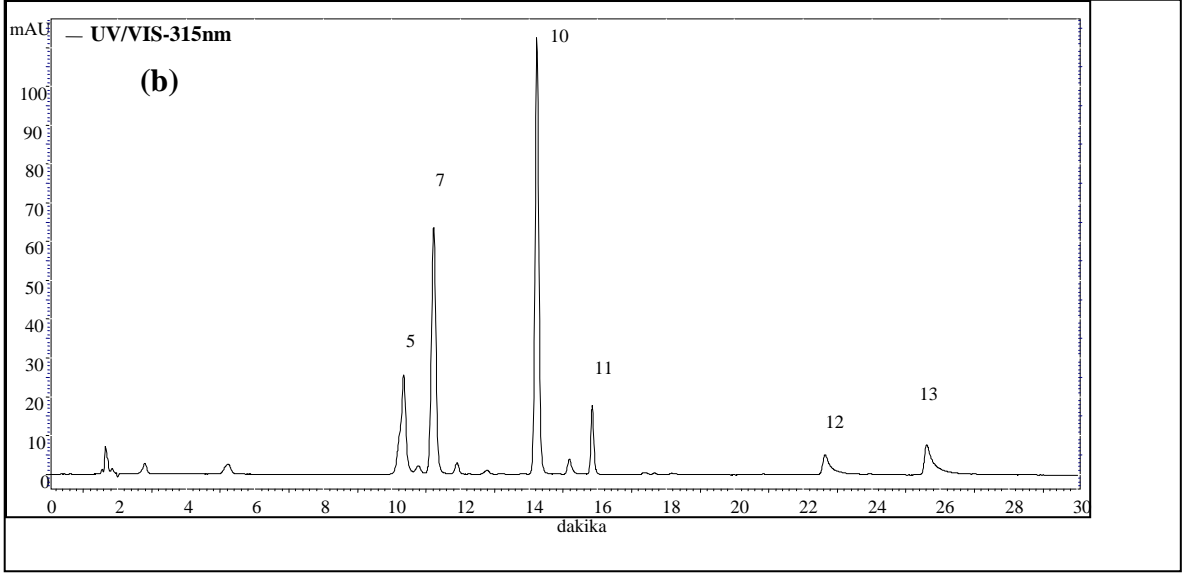
3.1. Anzer Çayından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimize Edilmesi

Ekstraksiyon optimizasyonu için bitkinin çiçek kısmına uygulanan bir seri ekstraksiyon sonucu fenolik bileşenlerin HPLC-UV ve spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini, yöntemleri ile analizine dayanmaktadır. Aynı zamanda bitkinin çiçek, yaprak ve dal olmak üzere her üç kısmına uygulanan direkt metanolik ekstraksiyon ve asidik hidroliz sonucu sıvı-sıvı ekstraksiyonu da bu bitkinin fenolik bileşenlerinin analizi için seçilmesi gereken yöntemi belirleme konusunda katkıda bulunmaktadır.

3.1.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-UV Metot Optimizasyonu

Optimize edilen HPLC-UV metodu kullanılarak 13 standart fenolik bileşiğin analizine bir örnek Şekil 6'da görülmektedir.





Şekil 6. HPLC-UV tarafından 280 nm (a) ve 315 nm'de (b) 5 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Koşullar: Kolon: C18 kolon (150 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm), hareketli faz: (A) suda % 2 asetik asit, (B) 70:30 asetonitril/su. Enjeksiyon hacmi: 25 µL, sıcaklık: 30°C.

HPLC-UV ile 13 fenolik standardın analiz edildiği metot hassasiyet ve güçlülük açısından değerlendirildi. Alıkonma zamanı ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği LOD için hazırlanan standart karışımının 7 kez enjeksiyonu ile belirlendi. Ayrıca analitin mevcut olup olmadığını belirlemek için gerekli en küçük miktar (LOD) ve güvenilir kantitatif analiz yapabilmek için gerekli en küçük miktar olan tespit sınırı (LOQ) değerleri Tablo 3'de mevcuttur.

Tablo 3. Optimize edilen HPLC-UV metodunun parametreleri

No	RT	Standartlar	R ²	%BSS(RT)	%BSS(Alan)	LOD ^{***}	LOQ [*]
1	2,78	Gallik Asit	0,998	0,241	4,479	0,135	0,449
2	5,21	Protokatekuik Asit	0,999	0,239	2,506	0,086	0,285
3	8,64	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	0,999	0,657	3,164	0,124	0,414
4	9,72	Kateşin	0,999	0,580	3,966	0,325	1,083
5	10,35	Klorojenik Asit	0,999	0,783	2,409	0,497	1,657
6	10,78	Vanilik Asit	0,999	0,354	1,808	0,483	1,609
7	11,22	Kafeik Asit	0,999	0,463	1,175	0,225	0,749
8	11,91	Siringik Asit	0,999	0,361	1,693	0,065	0,217
9	12,71	Epikateşin	0,998	0,385	1,675	0,091	0,302
10	14,24	<i>p</i> -Kumarik Asit	0,999	0,205	0,934	0,177	0,591
11	15,86	Rutin	0,999	0,137	1,991	0,175	0,583
12	22,66	Kuersetin	0,995	0,109	9,127	0,232	0,773
13	25,62	Kamferol	0,998	0,076	7,192	0,184	0,614
14	36,91	Propilparaben (IS)	—	0,069	4,107	0,179	0,596

* : mg/L cinsinden

** : LOD ve LOQ değerleri, anlamlı rakam sayısı virgülden sonra 3 haneli olarak verildi.

Tablo 3’de analit konsantrasyonuna karşı elde edilen absorban değerlerinin doğrusallığı R² olarak değerlendirildi. Yüzde bağıl standart sapmalar (% BSS), alıkonma zamanları ve pik yükseklikleri için hesaplandı. Dedeksiyon limitleri LOD ve LOQ değerleri mg/L cinsinden verildi.

3.1.2. Anzer Çayından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun HPLC-UV ile Optimize Edilmesi

Optimize edilen HPLC-UV yöntemi ile ekstraktlar analiz edildi. Sonuçlar spike yöntemine göre % geri kazanım cinsinden hesaplandı ve hekzan ile başlayan ve metanol ile başlayan ekstraksiyonlar ayrı ayrı tablolar halinde Tablo 4 ve Tablo 5’de sırasıyla verildi.

Tablo 4. Hekzan ile başlayan çiçek ekstraksiyonlarına ait HPLC-UV ile ölçülen % geri kazanım değerleri

Standartlar	% Geri Kazanım (hekzan)					
	Hidroliz	pH=2	pH=7	Direkt	SPE-1	SPE-2
Gallik Asit	67,25 (±7,01)	79,92 (±5,53)	58,83 (±12,55)	73,25 (±5,62)	79,50 (±8,5)	65,92 (±7,32)
Protokatekuik Asit	86,58 (±8,40)	124,00 (±18,04)	129,75 (±17,75)	164,92 (±24,58)	101,25 (±3,69)	11,75 (±1,92)
<i>p</i> -OH Benzoik Asit	90,91 (±14,12)	105,58 (±10,56)	114,16 (±15,9)	111,58 (±17,86)	86,08 (±7,88)	95,75 (±12,85)
Kateşin	60,41 (±36,55)	79,83 (±30,98)	80,83 (±39,72)	65,50 (±16,25)	1,25 (±0,66)	2,25 (±0,35)
Klorojenik Asit	47,00 (±25,78)	24,25 (±12,45)	115,00 (±25,73)	56,00 (±24,87)	11,75 (±4,87)	7,00 (±1,54)
Vanilik Asit	143,00 (±3,54)	122,00 (±15,96)	135,50 (±36,5)	137,25 (±35,44)	95,00 (±7,26)	106,88 (±22,45)
Kafeik Asit	112,00 (±35,67)	113,50 (±43,85)	210,25 (±102,29)	236,25 (±112,56)	43,50 (±15,62)	117,75 (±21,14)
Siringik Asit	84,62 (±31,28)	136,87 (±15,73)	151,75 (±26,16)	148,25 (±18,38)	91,91 (±13,57)	98,25 (±20,11)
Epikateşin	89,00 (±20,28)	111,75 (±29,23)	117,75 (±21,28)	133,50 (±30,58)	0	34,50 (±11,28)
<i>p</i> -Kumarik Asit	87,00 (±19,29)	102,50 (±21,86)	125,75 (±33,34)	126,00 (±17,28)	75,00 (±4,24)	89,00 (±24,39)
Rutin	–	–	–	–	9,25 (±3,29)	11,50 (±2,32)
Kuersetin	424,00 (±76,29)	84,50 (±18,25)	155,87 (±27,64)	317,00 (±35,44)	96,50 (±15,46)	88,5 (±17,78)

Tablo 5. Metanol ile başlayan çiçek ekstraksiyonlarına ait HPLC-UV ile ölçülen % geri kazanım değerleri

Standartlar	%Geri Kazanım (Metanol)					
	Hidroliz	pH=2	pH=7	Direkt	SPE-1	SPE-2
Gallik Asit	49,83 (±3,37)	82,08 (±4,31)	66,75 (±10,63)	72,66 (±8,03)	80,66 (±7,09)	65,00 (±5,66)
Protokatekuik Asit	85,50 (±12,34)	128,08 (±19,359)	146,87 (±29,77)	129,25 (±19,93)	85,83 (±15,68)	99,41 (±15,52)
<i>p</i> -OH Benzoik Asit	78,58 (±15,89)	97,41 (±15,84)	101,58 (±14,57)	103,75 (±23,65)	87,25 (±7,30)	78,91 (±6,24)
Kateşin	7,75 (±1,76)	42,25 (±22,78)	23,00 (±11,66)	64,00 (±39,24)	1,37 (±0,53)	2,75 (±1,06)
Klorojenik Asit	37,00 (±14,76)	42,25 (±10,86)	99,00 (±15,82)	61,00 (±20,16)	11,75 (±5,73)	8,25 (±2,57)
Vanilik Asit	107,50 (±21,92)	119,17 (±26,84)	86,50 (±2,83)	109,63 (±17,85)	97,58 (±6,20)	90,58 (±20,02)
Kafeik Asit	95,75 (±17,81)	161,75 (±24,57)	179,25 (±35,11)	301,25 (±45,51)	59,25 (±5,38)	147,00 (±17,65)
Siringik Asit	150,25 (±17,32)	114,25 (±24,04)	150,62 (±22,80)	158,37 (±25,63)	88,58 (±15,28)	78,91 (±12,76)
Epikateşin	62,75 (±30,19)	48,58 (±21,28)	52,58 (±25,57)	10,67 (±4,09)	0	17,17 (±9,91)
<i>p</i> -Kumarik Asit	44,36 (±23,33)	64,58 (±33,76)	65,38 (±30,50)	132,37 (±46,84)	79,25 (±2,12)	41,16 (±20,21)
Rutin	2,50 (±1,23)	105,25 (±23,65)	119,00 (±16,74)	303,50 (±38,68)	56,00 (±9,86)	–
Kuersetin	102,50 (±25,78)	130,37 (±31,84)	126,16 (±20,24)	337,25 (±28,66)	91,25 (±10,72)	398,75 (±26,29)

HPLC-UV analizleri sonucu optimizasyona tabi tutulan çiçek kısmının seçilen tüm yöntemler sonucunda kantitatif olarak hesaplanan fenolik madde içeriği hekzanla başlayan ekstraktlar için Tablo 6’da ve metanolden başlayan ekstraktlar için Tablo 7’de verildi.

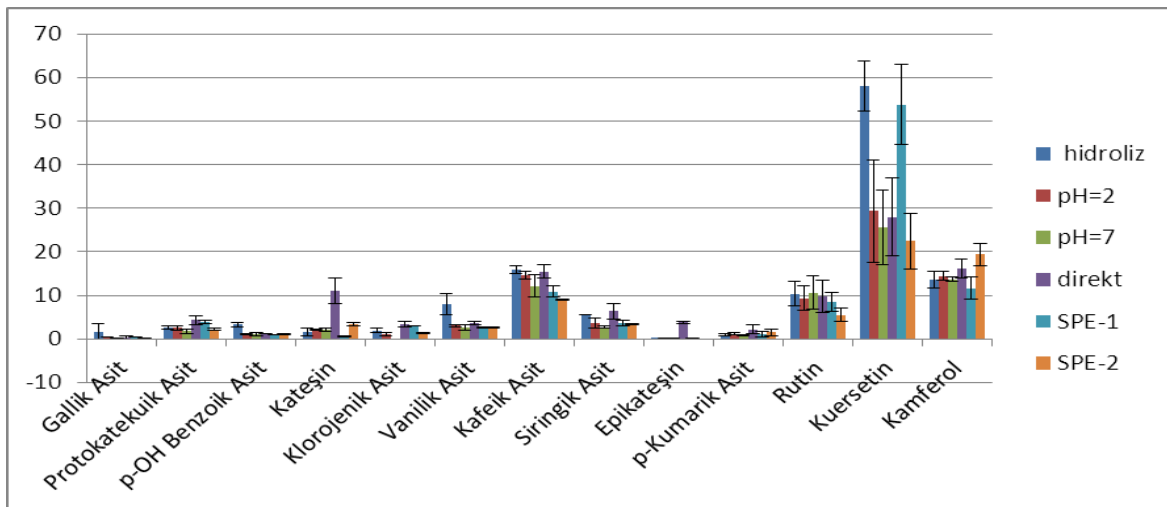
Tablo 6. HPLC-UV ile çiçek ekstraktlarının tüm ekstraksiyon koşullarında hekzan ile başlayan ekstraktlarının analiz sonuçları (mg/g havada kuru madde)

No	Standartlar	Hekzan					
		Hidroliz	pH=2	pH=7	Direkt	SPE-1	SPE-2
1	Gallik Asit	1,62 (±1,76)	0,39 (±0,04)	0,23 (±0,01)	0,34 (±0,30)	0,43 (±0,05)	0,235 (±0,01)
2	Protokatekuik Asit	2,68 (±0,39)	2,52 (±0,48)	1,74 (±0,55)	4,31 (±0,98)	3,89 (±0,38)	2,15 (±0,25)
3	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	3,34 (±0,49)	1,13 (±0,11)	1,09 (±0,31)	1,13 (±0,02)	0,95 (±0,01)	1,04 (±0,09)
4	Kateşin	1,52 (±0,90)	2,06 (±0,08)	2,05 (±0,29)	11,11 (±2,97)	0,53 (±0,18)	3,44 (±0,37)
5	Klorojenik Asit	1,88 (±0,54)	1,12 (±0,36)	0	3,36 (±0,59)	2,97 (±0,06)	1,37 (±0,07)
6	Vanilik Asit	7,95 (±2,37)	3,02 (±0,17)	2,66 (±0,63)	3,63 (±0,35)	2,62 (±0,08)	2,57 (±0,20)
7	Kafeik Asit	15,98 (±0,87)	14,63 (±0,79)	12,12 (±2,56)	15,43 (±1,52)	10,84 (±1,27)	8,990 (±0,156)
8	Siringik Asit	5,56 (±0,08)	3,69 (±1,18)	2,67 (±0,29)	6,32 (±1,88)	3,58 (±0,62)	3,47 (±0,12)
9	Epikateşin	0,03 (±0,01)	0,04 (±0,01)	0,03 (±0,02)	3,79 (±0,32)	0,17 (±0,12)	0
10	<i>p</i> -Kumarik Asit	0,90 (±0,17)	1,18 (±0,33)	0,78 (±0,22)	2,19 (±0,99)	1,01 (±0,65)	1,55 (±0,79)
11	Rutin	10,29 (±2,78)	9,29 (±2,77)	10,54 (±3,81)	9,84 (±3,69)	8,47 (±2,06)	5,49 (±1,48)
12	Kuersetin	57,99 (±5,69)	29,32 (±11,76)	25,58 (±8,67)	27,99 (±8,86)	53,810 (±9,21)	22,48 (±6,35)
13	Kamferol	13,62 (±1,93)	14,38 (±1,01)	13,66 (±0,49)	16,12 (±2,23)	11,54 (±2,55)	19,34 (±2,65)

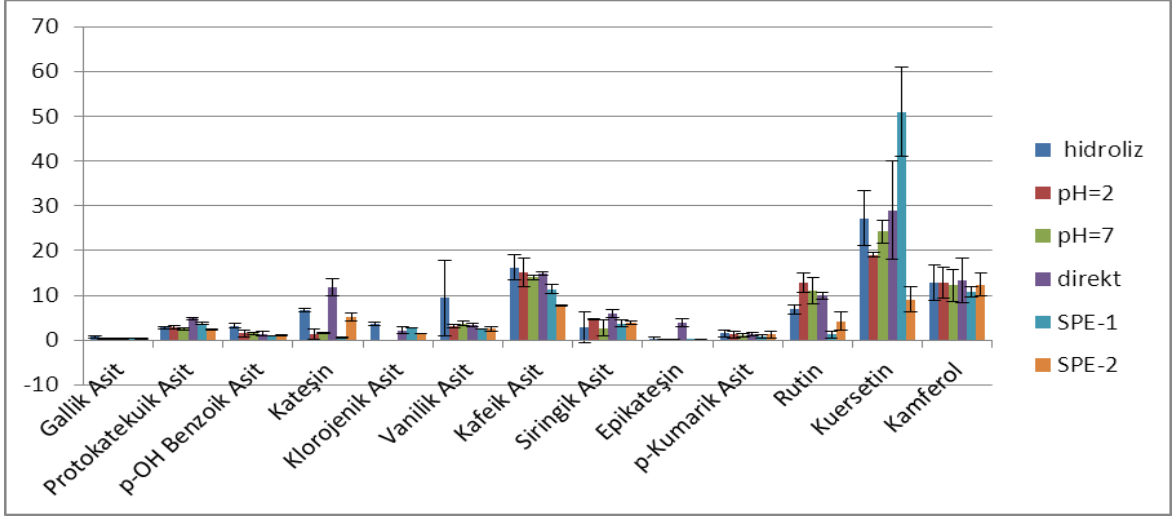
Tablo 7. HPLC-UV ile çiçek ekstraktlarının tüm ekstraksiyon koşullarında metanol ile başlayan ekstraktlarının analiz sonuçları (mg/g havada kuru madde)

No	Standartlar	Metanol					
		Hidroliz	pH=2	pH=7	Direkt	SPE-1	SPE-2
1	Gallik Asit	0,69 (±0,25)	0,38 (±0,11)	0,27 (±0,07)	0,39 (±0,12)	0,38 (±0,02)	0,31 (±0,08)
2	Protokatekuik Asit	2,83 (±0,26)	2,86 (±0,28)	2,58 (±0,24)	4,78 (±0,27)	3,68 (±0,22)	2,39 (±0,11)
3	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	3,18 (±0,5)	1,46 (±0,84)	1,50 (±0,33)	1,44 (±0,46)	0,91 (±0,04)	1,12 (±0,19)
4	Kateşin	6,67 (±0,33)	1,39 (±1,11)	1,51 (±0,16)	11,72 (±1,95)	0,44 (±0,12)	5,22 (±0,89)
5	Klorojenik Asit	3,59 (±0,48)	0	0	2,20 (±0,81)	2,75 (±0,08)	1,35 (±0,02)
6	Vanilik Asit	9,37 (±8,39)	3,13 (±0,41)	3,66 (±0,52)	3,30 (±0,39)	2,51 (±0,03)	2,53 (±0,46)
7	Kafeik Asit	16,20 (±2,87)	15,21 (±3,21)	13,99 (±0,51)	14,97 (±0,37)	11,33 (±1,02)	7,79 (±0,12)
8	Siringik Asit	2,93 (±3,44)	4,59 (±0,12)	2,71 (±1,84)	5,91 (±0,88)	3,72 (±0,74)	3,91 (±0,36)
9	Epikateşin	0,31 (±0,31)	0,05 (±0,03)	0,03 (±0,02)	3,93 (±0,94)	0,04 (±0,01)	0,13 (±0,05)
10	<i>p</i> -Kumarik Asit	1,45 (±0,68)	1,25 (±0,73)	1,04 (0,36)	1,40 (±0,41)	0,84 (±0,39)	1,27 (±0,79)
11	Rutin	6,81 (±0,94)	12,73 (±2,13)	11,04 (±2,95)	9,90 (±0,84)	1,20 (±0,79)	4,18 (±2,06)
12	Kuersetin	27,20 (±6,14)	19,05 (±0,49)	24,24 (±2,55)	29,02 (±10,88)	50,97 (±10,03)	9,08 (±2,84)
13	Kamferol	12,87 (±3,89)	12,80 (±3,51)	12,22 (±3,59)	13,27 (±5,01)	10,82 (±1,081)	12,41 (±2,52)

Sonuçlar karşılaştırma açısından daha anlaşılır olması için grafik şeklinde Şekil 7 ve Şekil 8’de verildi.

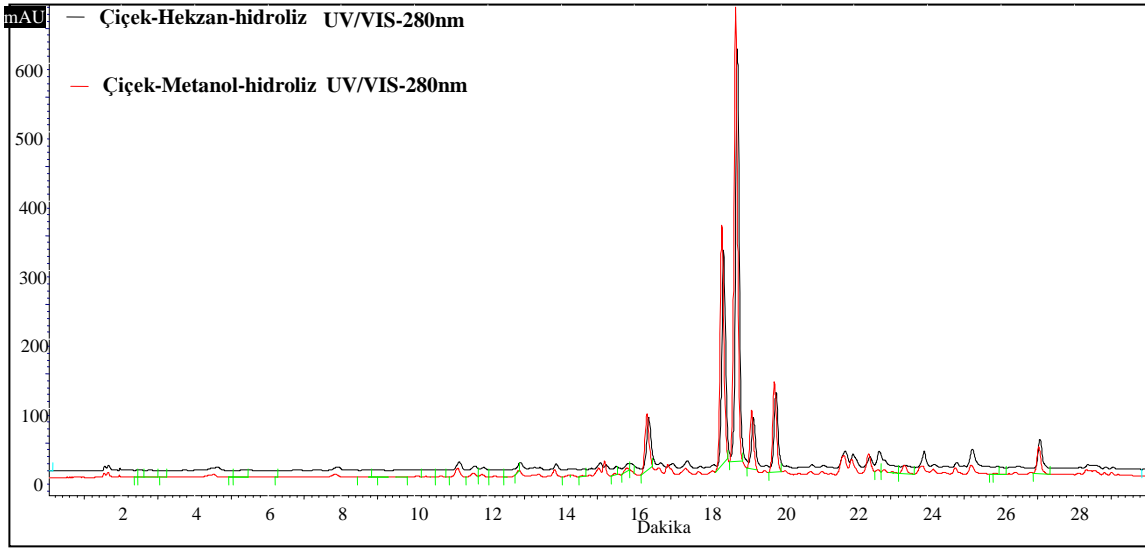


Şekil 7. Hekzan ile başlayan çiçek ekstraksiyonunun HPLC-UV analizlerinin grafiksel sonuçları

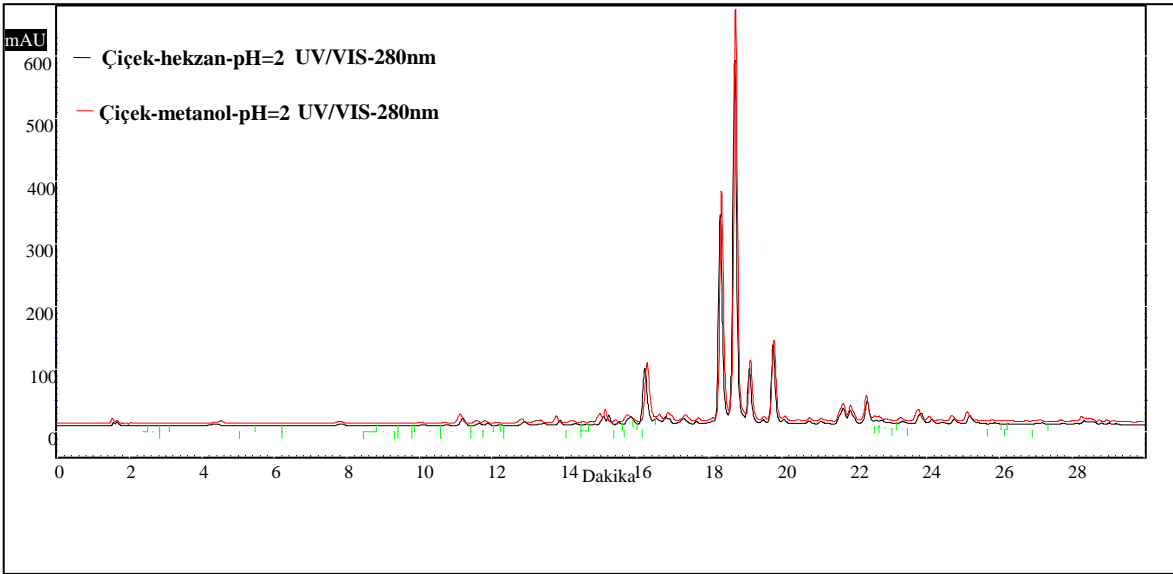


Şekil 8. Metanol ile başlayan çiçek ekstraksiyonunun HPLC-UV analizlerinin grafiksel sonuçları

HPLC-UV ile fenolik bileşiklerin optimizasyon sonuçlarına göre Anzer çayının yaprak ve dal kısımlarından fenolik bileşiklerin analizinin gerçekleştirilmesi için Tablo 4 ve Tablo 5'deki geri kazanım değerlerinin yanısıra kromatografik olarak analizlerin daha doğru yapılabilmesi için ekstraktların kromatogramları da incelendi. Ekstraksiyonların hekzan ve metanol ile başlayan kısımların karşılaştırılması için hekzandan başlayan hidrolizli ekstrakt ile metanolden başlayan hidrolizli ekstrakt aynı kromatogramda Şekil 9'da ve hekzandan başlayan pH=2 ekstraktı ile metanolden başlayan pH=2 ekstraktı aynı kromatogramda Şekil 10'da verildi.

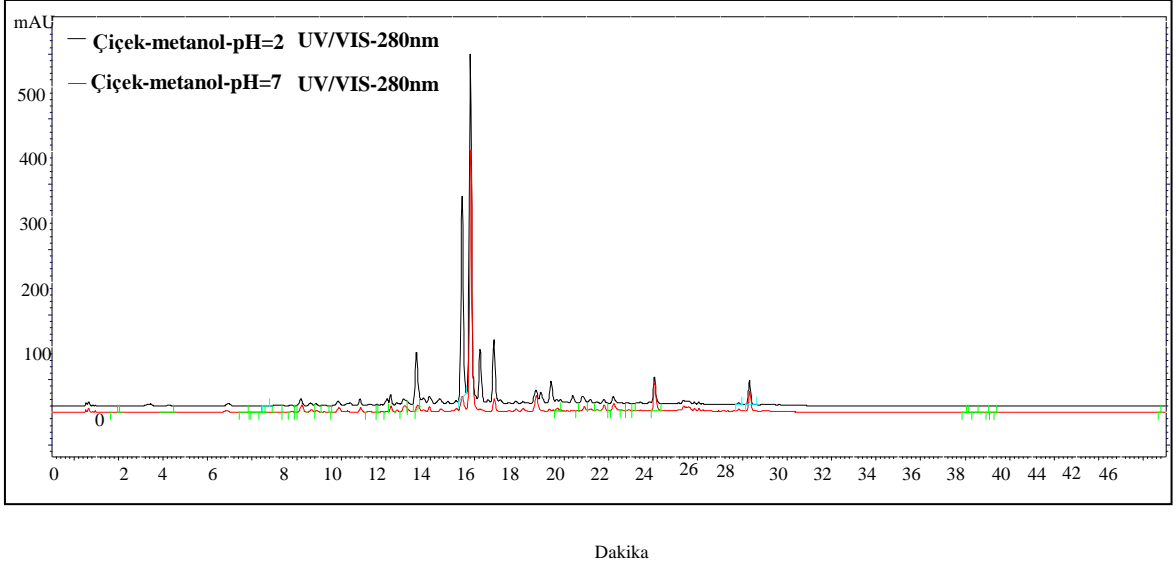


Şekil 9. Çiçek kısmının hekzan ve metanol ile başlayan hidrolizli ekstraktlarının 280 nm’de HPLC-UV kromatogramları



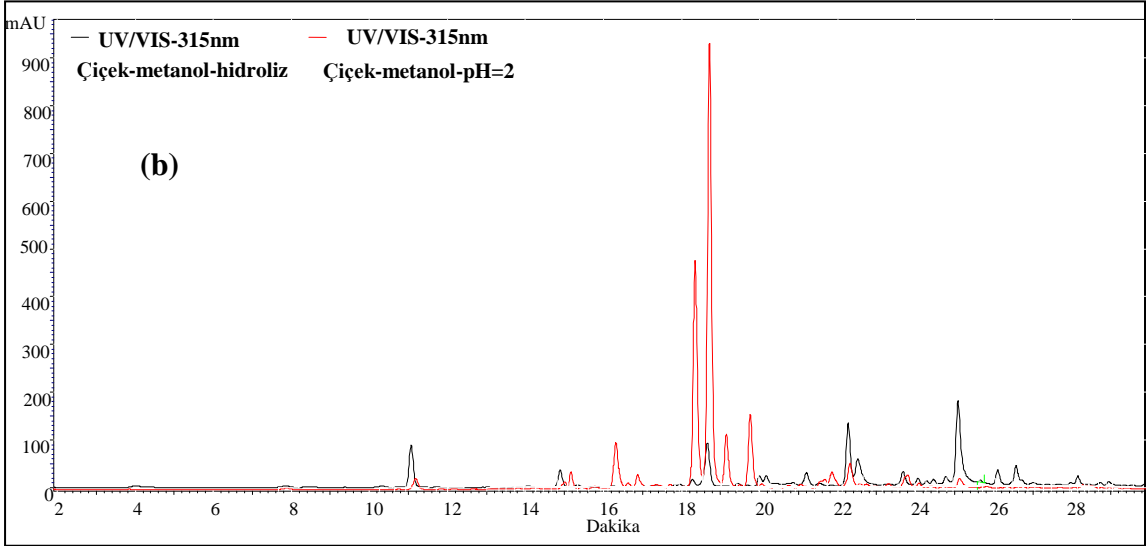
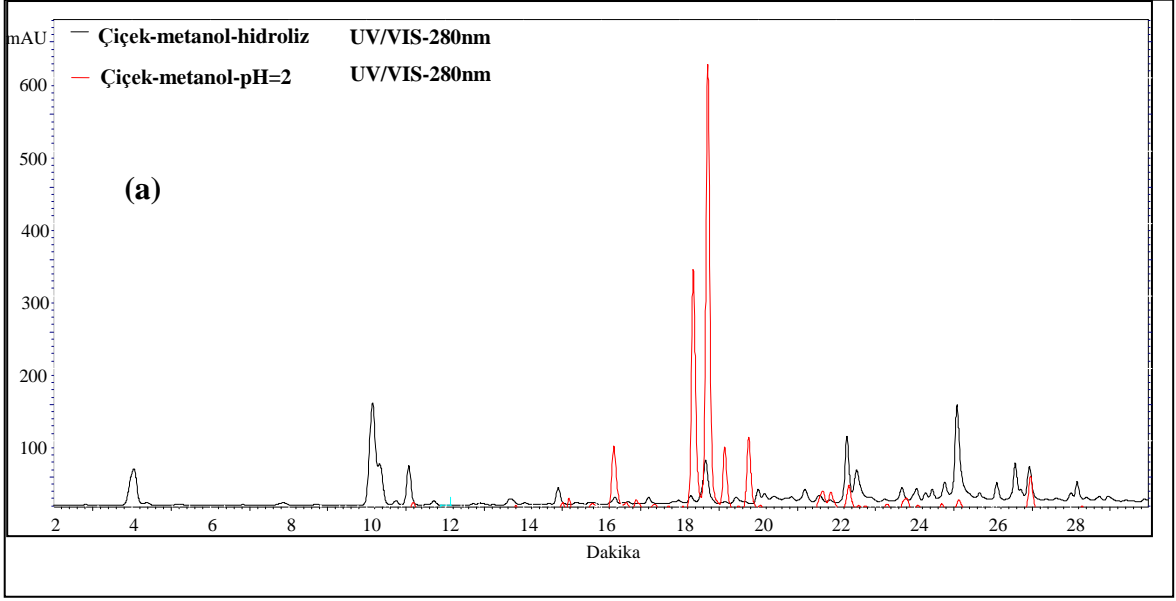
Şekil 10. Çiçek kısmının hekzan ve metanol ile başlayan pH=2’deki ekstraktlarının 280 nm’de HPLC-UV kromatogramları

Ekstraktlardan metanol ile başlayan pH=2 ve pH=7’de elde edilenlerin karşılaştırılması açısından örnek bir kromatogramda her iki ekstrakt birlikte Şekil 11’de verildi.



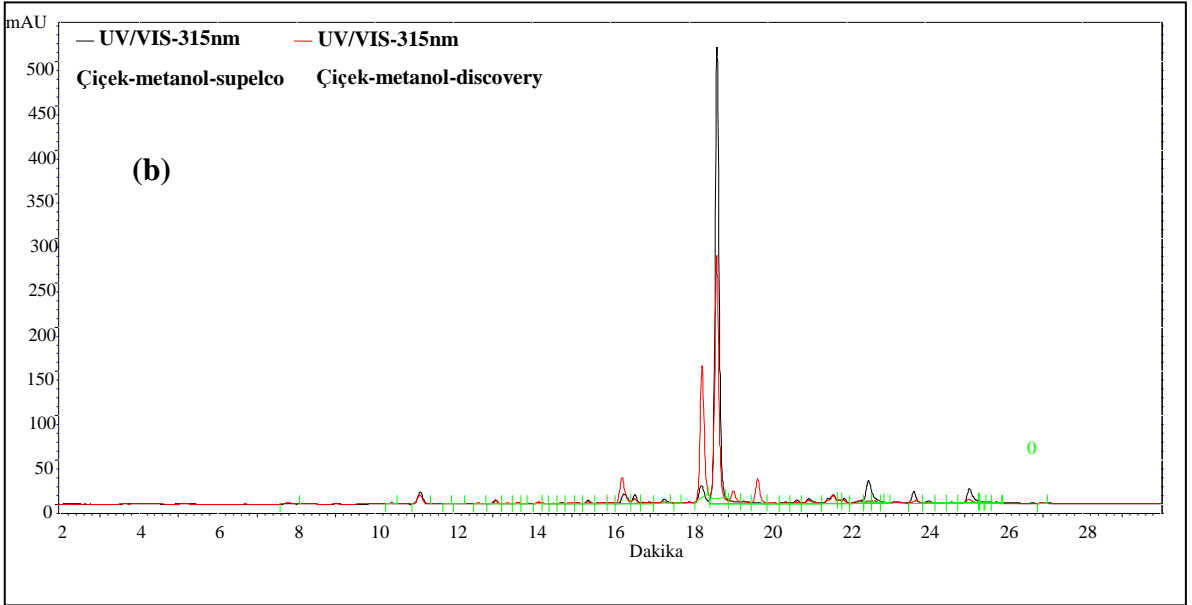
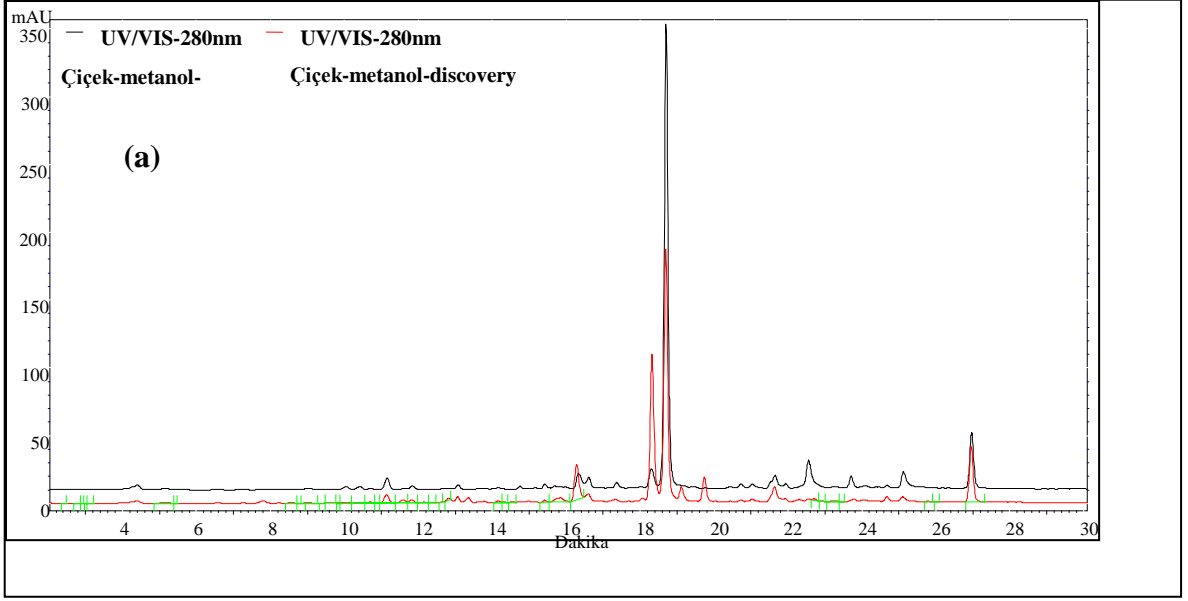
Şekil 11. Çiçek kısmına ait metanol ile başlayan pH=2 ve pH=7’de elde edilen ekstraktların 280 nm’de HPLC-UV kromatogramları

Çiçek kısmının metanol ile başlayan pH=2 ve hidrolizli karşılaştırılması açısından örnek bir kromatogramda her iki ekstrakt birlikte Şekil 12’de verildi.



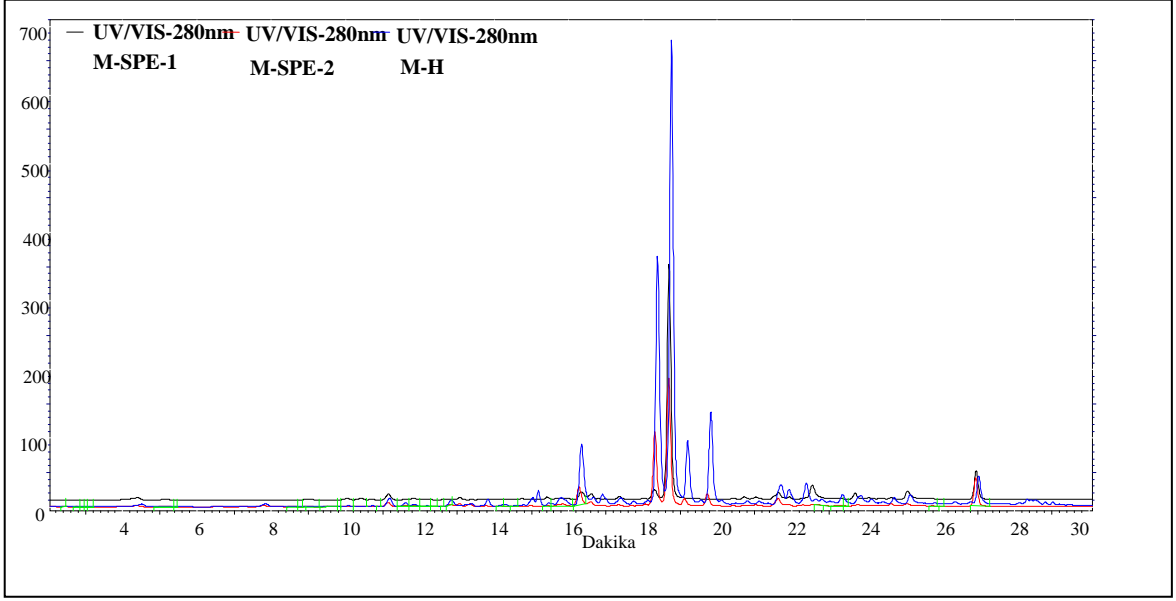
Şekil 12. Çiçek kısmına ait metanol ile başlayan pH=2 ve hidroliz ile elde edilen ekstraktların 280 nm (a) ve 315 nm'de (b) HPLC-UV kromatogramları

Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan iki farklı kartuşdan (1. Supelco LC-SAX SPE anyon-değişim fonksiyonlu quaterner amin gruplarıyla modifiye ve 2. Discovery DPA-6S (Supelco, Germany) amid gruplarıyla modifiye edilen silika uçlara sahip ters faz fonksiyonlu) elde edilen ekstraktların karşılaştırılması için Şekil 13'de çiçek kısmının metanol ile başlayan katı faz ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramları verildi.



Şekil 13. Çiçek kısmının metanol ile başlayan supelco (a) ve discovery (b) katı faz ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların HPLC-UV kromatogramları

Ayrıca metanol ile başlayan hidrolizli örnek bir ekstraktın katı faz ekstraktları ile karşılaştırılması için Şekil 14'de aynı kromatogramda 280 nm'de incelendi.



Şekil 14. İki katı faz ekstraktları ile hidrolizli ekstraktın HPLC-UV kromatogramları

Anzer çayı fenolik bileşim içeriği başlıca sinamik asit ve flavonoid türevlerinden oluşması sebebiyle ve optimize edilen HPLC-UV yöntemine göre analiz edilebilecek olan standartlarımızdan rutin haricinde bu grup bileşiklerin şeker ya da başka grup bağlı türevlerinin mevcut olmayışından dolayı hidrolizli ekstraksiyon yönteminin bitkinin fenolik bileşiminin belirlenmesi açısından en uygun yöntem olduğu tespit edildi.

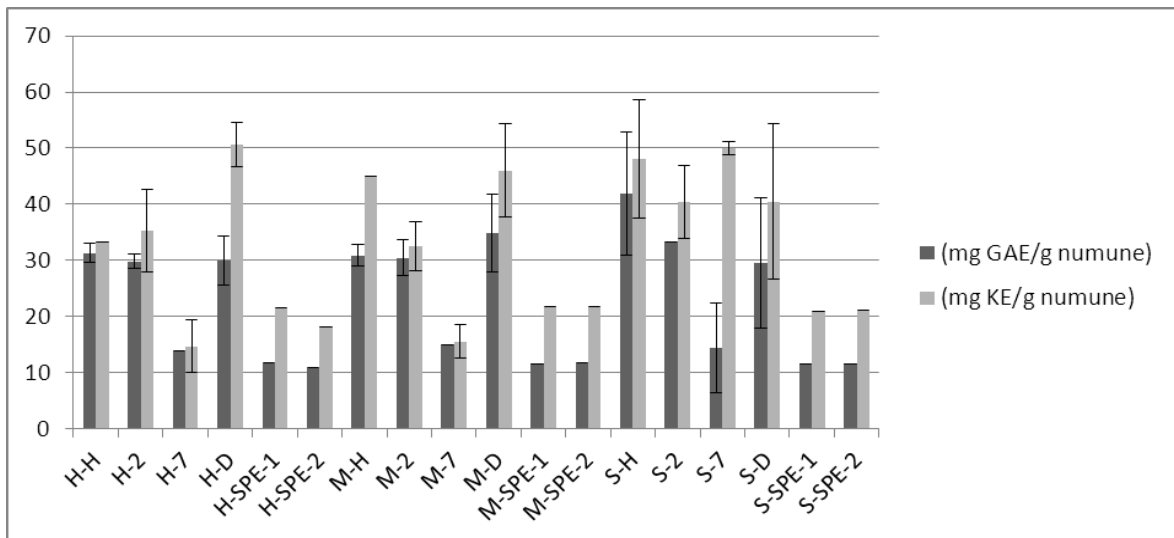
3.1.3. Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayinine Göre Fenolik Madde Ekstraksiyonun Optimizasyonu

Spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini 3 paralel olarak bir seri farklı yöntem ile elde edilen ekstraktlara uygulandı ve sonuçları gallik asit ve kateşin ekivalent olarak Tablo 8’de verildi. Burada birim olarak mg toplam fenolik/g havada kuru madde kullanıldı.

Tablo 8. Ekstraktların mg standart ekivalenti/g havada kuru madde cinsinden toplam fenolik madde tayini sonuçları

No	Ekstraktlar	mg GAE/ g havada kuru madde	mg KE/ g havada kuru madde
1	H-H	31,243 (±1,720)	33,252 (±0,320)
2	H-2	29,794 (±1,330)	35,277 (±7,330)
3	H-7	13,844 (±0,210)	14,677 (±4,750)
4	H-D	30,009 (±4,350)	50,672 (±3,900)
5	H-SPE-1	11,650 (±0,070)	21,522 (±0,290)
6	H-SPE-2	10,866 (±0,030)	18,138 (±0,100)
7	M-H	30,877 (±1,950)	45,059 (±0,890)
8	M-2	30,438 (±3,180)	32,462 (±4,430)
9	M-7	14,843 (±0,230)	15,557 (±3,070)
10	M-D	34,903 (±6,970)	46,034 (±8,220)
11	M-SPE-1	11,588 (±0,030)	21,716 (±0,220)
12	M-SPE-2	11,700 (±0,130)	21,738 (±0,560)
13	S-H	41,948 (±10,980)	48,156 (±10,540)
14	S-2	33,166 (±0,980)	40,325 (±6,510)
15	S-7	14,298 (±8,000)	49,965 (±1,090)
16	S-D	29,517 (±11,640)	40,427 (±13,880)
17	S-SPE-1	11,583 (±0,020)	20,833 (±0,240)
18	S-SPE-2	11,561 (±0,170)	21,083 (±0,710)

Toplam fenolik madde tayin sonuçları ayrıca standart sapmaları ile birlikte grafiksel olarak da Şekil 15’de gösterilmiştir.



Şekil 15. Ekstraktların mg standart ekivalenti/g havada kuru madde cinsinden toplam fenolik madde tayini sonuçlarının hata çubukları ile birlikte grafiği

3.2. Anzer Çayının Çiçek, Yaprak ve Dal Kısımlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ile Analizleri

Ekstraksiyon optimizasyonu sonucunda yapılan tüm kapsamlı karşılaştırmalar neticesinde bitkinin yaprak ve dal kısımları için hidrolizli sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygun görülerek paralel olarak çiçek kısmına da bu ekstraksiyon uygulandı. Elde edilen ekstraktların % geri kazanım değerleri için spike yöntemi burada kullanılmadı ancak fenolik madde standartlarının belli konsantrasyonunu içeren çözeltiye aynı yöntem uygulanarak ekstraksiyon % geri kazanımı hesaplandı (Tablo 9).

Tablo 9. Fenolik madde standartlarının hidrolizli ekstraksiyonunun % geri kazanım değerleri

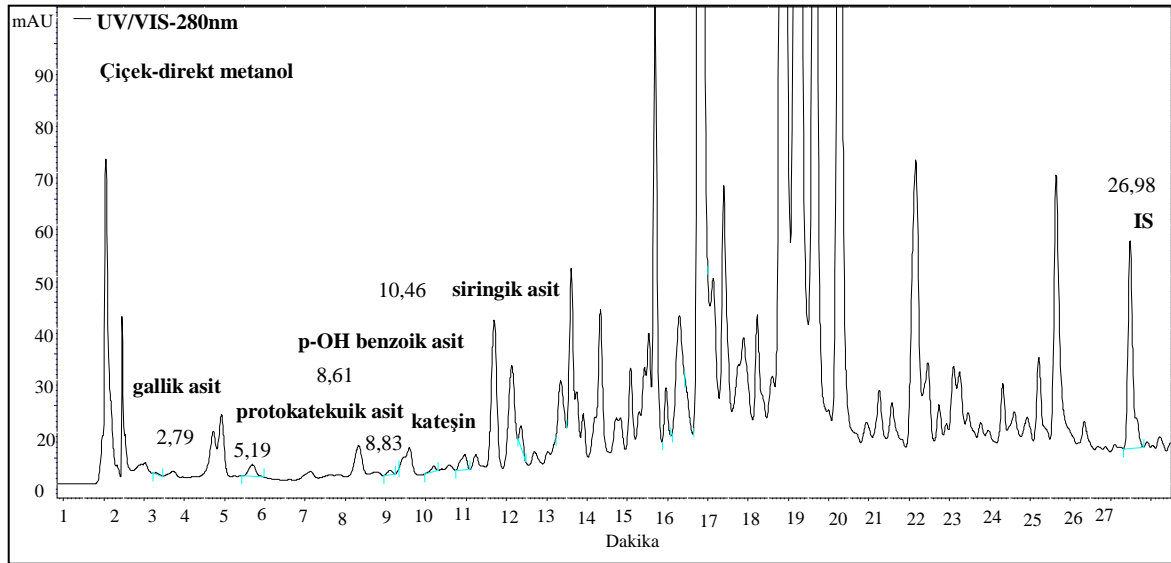
No	Standart	% Geri Kazanım
1	Gallik Asit	84,27(±5,55)
2	Protokatekuik Asit	119,01(±15,71)
3	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	97,18(±9,90)
4	Kateşin	15,69(±22,44)
5	Klorojenik Asit	12,93(±6,40)
6	Vanilik Asit	93,21(±10,63)
7	Kafeik Asit	32,77(±8,73)
8	Siringik Asit	107,98(±10,68)
9	Epikateşin	158,78(±186,91)
10	<i>p</i> -Kumarik Asit	28,88(±13,97)
11	Rutin	2,73(±2,21)
12	Kuersetin	90,93(±26,94)
13	Kamferol	63,91(±11,79)

Tablo 9’da verilen % geri kazanım değerleri epikateşin ve kateşin cinsinden incelendiğinde, kateşinin çok düşük, epikateşinin çok yüksek bir geri kazanıma sahip olması birbirlerine dönüşümlerinin olabileceği ile açıklanabilir.

Çiçek, yaprak ve dal kısmından elde edilen ekstraktların HPLC-UV analizleri ile kantitatif sonuçları mg fenolik bileşenler /g havada kuru madde cinsinden Tablo 10’da verildi.

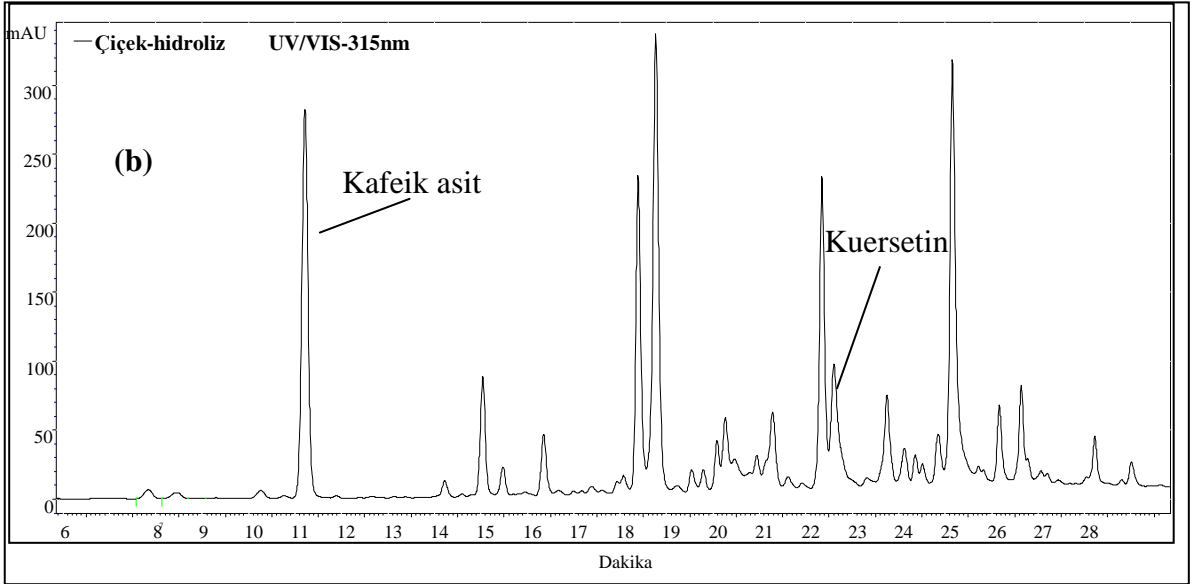
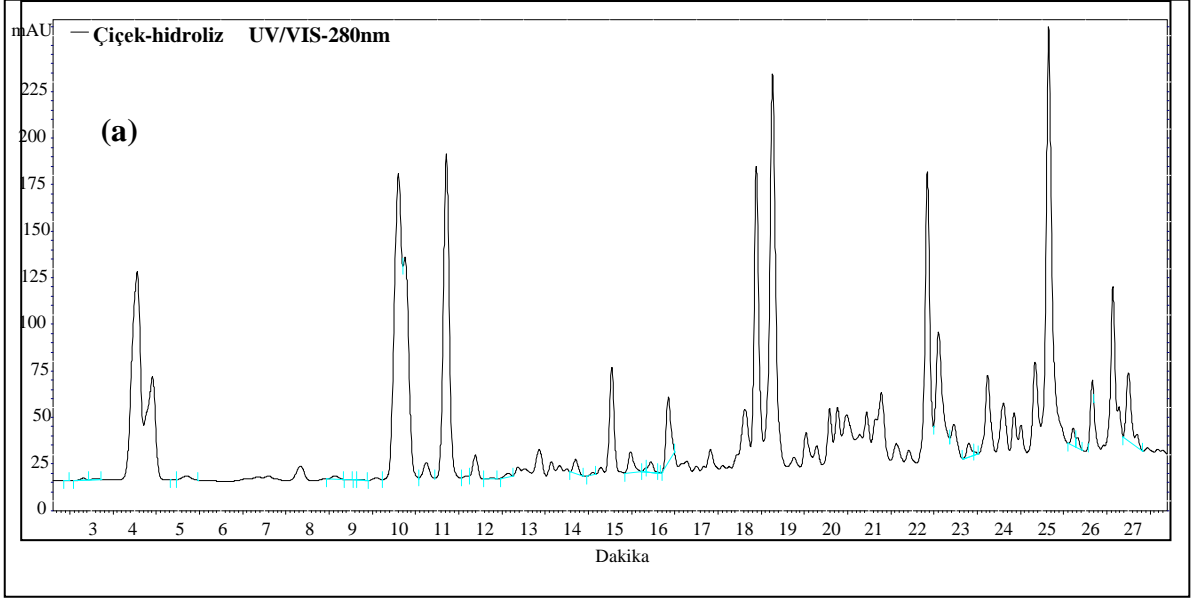
Tablo 10. Bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımlarına ait hidrolizli ve direkt ekstraktların HPLC-UV ile kantitatif analiz sonuçları

No	Standartlar	Hidroliz (mg/g havada kuru madde)			Direkt metanol (mg/g havada kuru madde)		
		Çiçek	Yaprak	Dal	Çiçek	Yaprak	Dal
1	Gallik Asit	0,08	0,17	0,08	0,04	0,01	0,10
2	Protokatekuik Asit	0,58	0,40	0,35	0,55	0,35	0,47
3	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	0,21	0,65	0,21	0,14	0,24	0,13
4	Kateşin	1,06	0,38	0,16	1,28	1,83	0,05
5	Klorojenik Asit	0,84	0,68	0,57	0,27	0,23	0,19
6	Vanilik Asit	1,63	1,30	1,81	0,47	0,19	0,63
7	Kafeik Asit	14,63	17,89	6,01	2,40	1,71	1,53
8	Siringik Asit	1,11	1,91	1,88	0,64	0,86	0,59
9	Epikateşin	1,54	0,76	1,18	0,00	2,08	0,03
10	<i>p</i> -Kumarik Asit	0,48	0,57	0,59	0,64	0,65	0,44
11	Rutin	0,21	1,01	0,38	2,64	3,53	2,81
12	Kuersetin	35,48	43,09	68,99	3,08	2,76	3,07
13	Kamferol	2,38	2,28	2,68	2,37	0,86	1,35



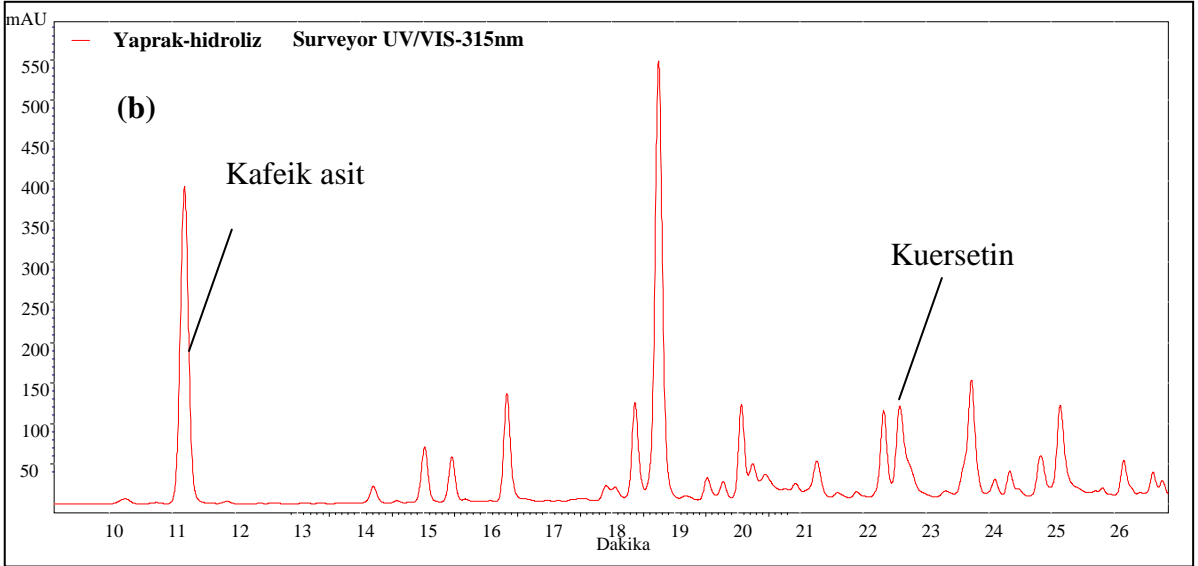
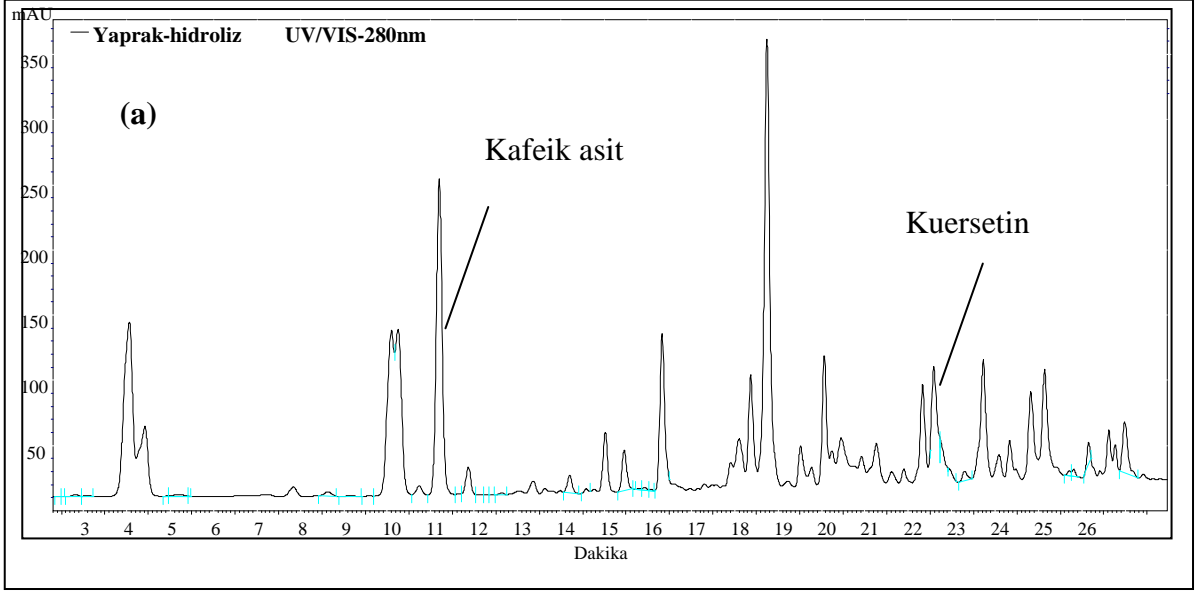
Şekil 16. Çiçek kısmının direkt ekstraktının 280 nm’de HPLC-UV kromatogramı

Örnek olarak Şekil 16’da verilen çiçek kısmının direkt ekstraktının HPLC-UV kromatogramı ile karşılaştırma yapmak amacıyla Şekil 17’de çiçek kısmına ait hidrolizli ekstraktının 280 nm ve 315 nm’deki HPLC-UV kromatogramı verildi.

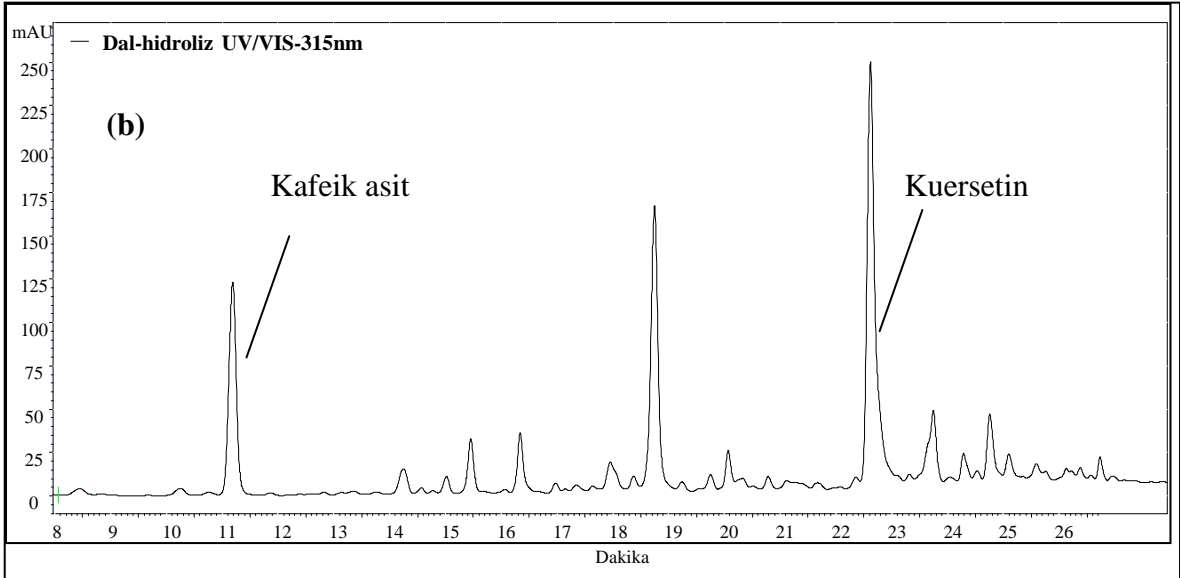
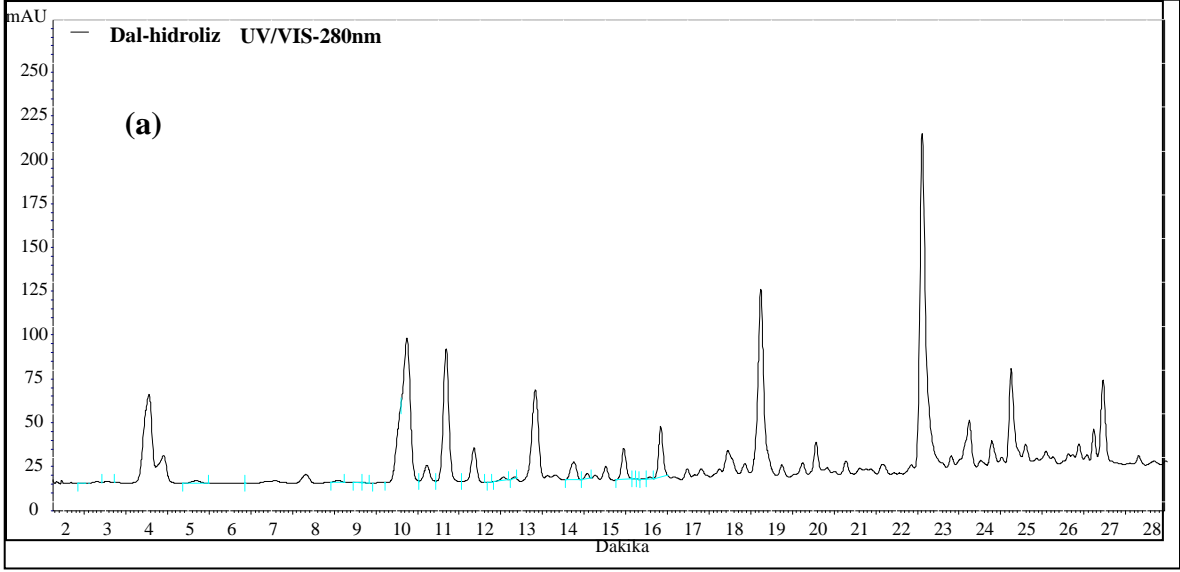


Şekil 17. Çiçek kısmının hidrolizli ekstraktının 280 nm (a) ve 315 nm'deki (b) HPLC-UV kromatogramı

Bitkinin yaprak ve dal kısımlarına ait hidrolizli ekstraktlara ait 280 nm ve 315 nm'deki HPLC-UV kromatogramları Şekil 18 ve Şekil 19'da verildi.



Şekil 18. Yaprak kısmının hidrolizli ekstraktının 280 nm ve 315 nm'de HPLC-UV kromatogramı



Şekil 19. Dal kısmının hidrolizli ekstraktının 280 nm ve 315 nm'de HPLC-UV kromatogramı

4. TARTIŞMA

4.1. Fenolik Bileşiklerin Anzer Çayından Ekstraksiyonunun Optimize Edilmesi

4.1.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-UV Metot Optimizasyonu

Optimize edilen RP-HPLC-UV metodu kullanılarak 13 standart fenolik bileşiğin analizine örnek bir kromatogram Şekil 6'da görülmektedir. Yöntem, 50 dakika içinde tüm standartların uygun bir şekilde ayrılmasını sağladı. Düşük konsantrasyonlarda alıkonma zamanlarının ve pik alanının tekrarlanabilirliği kabul edilebilir değerlerde bulundu (Tablo 3). Ayrıca tüm 13 standardın kalibrasyonlarından doğrusal cevaplar ($R^2 \sim 0,999$) elde edildi. Tüm standartlar en düşük tespit sınırı (LOD) ve en düşük tayin sınırı (LOQ) değerleri bitki materyallerinde fenolik bileşiklerin belirlenmesi için yeterli olacak şekilde LOD, 0,497 mg/L'nin altında ve LOQ değeri ise 1,657 mg/L'nin altında bulundu.

4.1.2. Anzer Çayından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun HPLC-UV ile Optimize Edilmesi

Anzer çayının çiçek kısmında gerçekleştirilen ekstraksiyon optimizasyonunun HPLC-UV analizleri ile elde edilen % geri kazanım sonuçları (Tablo 4 ve Tablo 5) ve tekrarlanabilirliklerinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olmayışı nedeniyle, Anzer çayının fenolik bileşimlerinin analizi için uygun ekstraksiyon yönteminin seçimi açısından net bir karar verilmesinde etkili olmadı. Tekrarlanabilirliğin düşmesi ile kimi zaman spike yöntemine göre standart eklenerek uygulanan ekstraksiyonların kantitatif değerlerinin standart eklenmeyen paralellerinden küçük değerleri verdikleri dahi gözlemlendi. Çalışmada tekrarlanabilirlik katı faz ekstraksiyonunda, sıvı-sıvı ekstraksiyonuna oranla oldukça yüksektir ki bu da teorik olarak bilinen katı faz ekstraksiyonunun bir avantajıdır.

HPLC-UV ile ekstraksiyon yöntemi optimizasyonunda uygun yöntem seçiminde yardımcı olması açısından üç paralel çalışmadan elde edilen ortalama sonuçlar standart sapmaları ile birlikte Tablo 6 ve Tablo 7'de ve grafiksel sonuçları ise Şekil 7 ve Şekil 8'de verildi. Standartların kantitatif verilerine göre bakıldığında bitkinin çiçek kısmında mevcut standartların tümünün bulunduğu gözlemlendi ama pek çok maddenin makro boyutta olanları tespit edilemedi. Standartların kimisi oldukça az miktarlarda iken başlıca kateşin, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, rutin, kuersetin ve kamferolün diğerlerine göre yüksek olduğu gözlemlendi. Özellikle sinamik asitlerden kafeik asit, flavonoidlerden rutin, kuersetin

ve kamferol bitkinin çiçek kısmındaki optimizasyon çalışmasında tüm yöntemler ile yüksek miktarda ekstrakte edilmeleri ile ön plana çıktı. Burada dikkati çeken bir durum kafeik asit ve kuersetinin hidroliz ile genel olarak artış göstermeleridir. Bitkinin çiçek kısmının bu analiz sonuçlarına göre en fazla kuersetin içerdiği ve kuersetinin en yüksek geri kazanım değerinin katı faz ekstraksiyonu ve özellikle de supelco LC-SAX katı faz kartuşundan elde edildiği gözlemlendi.

HPLC-UV yöntemi ile yapılan ekstraksiyon optimizasyonunun kantitatif sonuçların yanı sıra, kromatogramların genel profilleri de değerlendirildi.

Hekzan ile başlangıçta istenmeyen apolar bileşenlerin bitki matriksinden izole edilip ayrılması hedeflendi. Hekzan ekstraksiyonundan geri kalan daha sade bir matriks sayesinde kromatografik ayırımın ve kantitatif analizin daha doğru bir şekilde yapılabileceği kesindir. Bu açıdan Tablo 4 ve Tablo 5'den elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, hekzan ve metanol ile başlanan ekstraktlarda bazı bileşenler için hekzan bazı bileşenler için metanol ekstraktları yüksek geri kazanıma sahiptir. Kromatogramlar üzerinde de inceleme yapıldığında bitkinin çiçek kısmına uygulanan bir seri ekstraksiyondan hekzandan başlayan hidrolizli ve metanolden başlayan hidrolizli ekstraktlar Şekil 9'da karşılaştırıldı ve her iki kromatogramın da kolay ve doğru analiz edilebilmesi için yeterince temiz oldukları gözlemlendi. Ancak metanol ile başlayan ekstrakta ait piklerde genel olarak az da olsa bir yükseklik gözlemlendi. Bu da ekstraksiyona temizlik amacı ile katılan hekzanın bitki örneğinin analizi istenen bileşenleri üzerinde azaltıcı yönde etkili olduğunu gösterdi.

Bitkinin çiçek kısmının hekzandan başlayan ve metanolden başlayan pH=2'deki ekstraktlar Şekil 10'da karşılaştırıldı ve burada da her iki ekstraktlara ait kromatogramların oldukça sade oldukları gözlemlendi. Tüm bu incelemeler sonucunda Anzer çayı bitkisi için hekzan ekstraksiyonunun ilave bir aşama olarak kullanılmasının kromatogramların analizinde belirgin bir avantajının olmadığı çıkarıldı ve bitkinin diğer kısımlarının ekstraksiyonlarında hekzan aşaması uygulanmadı.

Ekstraksiyonlarda ortamın pH'ına göre bileşenlerin iyonlaşarak sulu fazı tercih etmeleri veya iyonlaşmadan organik faza alınabilirlikleri değişmektedir. Özellikle zayıf asidik özellik gösteren fenolik asitler için ekstraksiyon pH değerinin pKa değerinin altında seçilmesi sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile organik faza geçişlerinde etkili oldukları için önemlidir. Bu açıdan bu çalışmada analizleri yapılan fenolik bileşikler için hidroliz, pH=2 ve pH= 7'de uygulanan ekstraksiyonlar karşılaştırıldı. Çiçek kısmının pH=2 ve pH=7'de

elde edilen ekstraktlarına ait kromatogramların verildiği Şekil 11'e bakıldığında genel olarak bitki bileşenlerinin pH=2'de daha yüksek miktarda ekstrakte edildikleri gözlemlendi. Hidrolizli ekstraktları ile pH=2'de elde edilen ekstraktları Şekil 12'de verilen kromatograma göre incelediğimizde ise genel olarak esas pikler hidroliz ile azaldı, bazıları da kayboldu. Buradan Anzer çayında genel olarak fenolik bileşenlerin çeşitli türevlerinin mevcut olduğu ve bunların hidroliz ile parçalanarak çekirdek fenolik bileşenlere dönüştüklerini çıkarabiliriz. Bu hipotezimizi destekleyici olarak Şekil 12'ye ait 280 nm ve 315 nm'deki kromatogramlardan esas piklerin 315 nm'de daha yüksek absorbanza sahip oldukları görülmektedir. Kromatogramda elüe edilme profilleri de göz önüne alındığında, esas piklerin daha çok şeker grubu içeren flavonoidler ve çeşitli sinamik asit türevlerinden oluştuğu çıkarılmaktadır.

Uygulanan iki farklı katı materyal içeren katı faz ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların fenolik içeriğinin hem çeşitlilik hem de miktar açısından sıvı-sıvı ekstraksiyonuna göre oldukça düşük olduğu ancak tekrarlanabilirliğin katı faz ekstraksiyonunda çok daha yüksek olduğu gözlemlendi. Teorik olarak da katı faz ekstraksiyonu, yüksek tekrarlanabilirlikte bir ekstraksiyondur. İki farklı katı faz kartuşu ile elde edilen ekstraktlara ait HPLC-UV kromatogramları Şekil 13'de karşılaştırıldı ve her iki kartuşunda spesifik olarak yüksek oranda ekstrakte ettikleri bileşiklere ait pikler gözlemlendi. Kartuşların genel olarak aynı bileşikleri farklı miktarlarda tuttukları gözlemlendi. Katı faz ekstraktlarının kromatogramları mevcut fenolik asit standartlarıncaya oldukça fakir olmaları nedeniyle çalışmanın devamında katı faz ekstraksiyonu tercih edilmedi. Katı faz ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların kromatogramların hidroliz ile elde edilen ekstraktların kromatogramları ile karşılaştırması Şekil 14'de yapıldı ve hidrolizli sıvı-sıvı ekstraksiyonunun katı faz ekstraksiyonlarından belirgin şekilde yüksek geri kazanıma sahip oldukları gözlemlendi.

Bitkinin, sinamik asit ve flavonoidlerden kafeik asit, rutin, kuersetin ve kamferol içerdiği mevcut standartlarla karşılaştırılarak tesbit edildi. Fakat makro bileşenlerin standartları elimizde olmadığından bunların kesin teşhisi yapılamadı. Bitkideki sinamik asit ve flavonoid çekirdeklerinin analiz edilebilmeleri için, bu bileşiklerin çeşitli türevlerinin hidroliz ile parçalanıp çekirdek sinamik asit ve flavonoidlere dönüşümleri gereklidir. Bu bilgiler ışığında bitkinin yaprak ve dal kısımlarının ekstraksiyonları hidrolizli olarak yürütülüp direkt metanolik ekstraksiyonları da kontrol amaçlı elde edildi. Ayrıca fenolik madde standartlarının belli bir konsantrasyondaki karışıma da hidroliz

uygulanarak standartlar üzerine hidrolizin etkisi de incelendi. Flavonoid standartlarından kuersetinin hem kendisi hemde şeker grubu bağlı türevi olan rutin optimize edilen HPLC-UV analiz yönteminde mevcut olduğundan, hidroliz ile direkt ekstraksiyon sonuçlarının kuersetin ve rutin üzerinden değerlendirilmesi mümkün olacaktır.

4.1.3. Fenolik Madde Ekstraksiyonun Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayinine Göre Optimizasyonu

Türlerin direkt metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarına bakıldığında numuneler arasında ve özellikle hekzan ile başlayan çalışmada en yüksek olduğu (50,672 mg KE/g havada kuru madde) görüldü. Genel olarak bakıldığında ise hekzan ile başlayan ve metanol ile başlayan arasında, hekzan ile başlayanın daha yüksek olduğu, standartlı olanların ise daha düşük olduğu görüldü.

Hidrolizli ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarına baktığımızda, standartlı olan örneğinde en yüksek olduğu (48,156 mg KE/g havada kuru madde) ve bunu takiben, metanol ile başlayan ve hekzan ile başlayan örneklerinde genel olarak yüksek olduğu tesbit edildi.

pH=2 koşullarındaki ekstraktlarda ise standartlı olan örnekte en yüksek toplam fenolik madde miktarı (40,325 mg KE/g havada kuru madde) tespit edildi. pH=7 koşullarındaki ekstraktlarda ise standartlı örnekte en yüksek toplam fenolik madde miktarı (49,965 mg KE/g havada kuru madde) bulundu. pH=7 ile başlayan tayinlere bakıldığında, sıvı-sıvı ekstraksiyon için en düşük verim elde edildi.

Katı faz ekstraksiyonunda elde edilen toplam fenolik madde miktarı, seçimli ekstraksiyondan elde edilen toplam fenolik madde miktarından genel olarak daha düşük çıktı. SPE-1 ve SPE-2'yi birbiri ile karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçların birbirlerine çok yakın oldukları görüldü. SPE-1'den elde edilen en yüksek toplam fenolik madde miktarı, metanol ile başlayan çalışmadan elde edildi (21,716 mg KE/g havada kuru madde). SPE-2'de ise en yüksek toplam fenolik madde miktarı (21,738 mg KE/g havada kuru madde) bulundu. Genel olarak, katı faz ekstraksiyon ile olan çalışmalarda, metanol ile başlanan çalışmalardan elde edilen toplam fenolik madde miktarı, hekzan ile başlayan ekstraktlardan elde edilenlere göre daha yüksek bulundu.

4.2. Anzer Çayının Çiçek, Yaprak ve Dal Kısımlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ile Analizleri

Fenolik bileşenlerin bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımlarında analizlerinin değerlendirilmesi için yalnızca fenolik standartların bir karışımına uygulanan geri kazanım çalışması sonuçları Tablo 9'da verildi. % Geri kazanım değerleri kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve rutin için oldukça düşük iken genel olarak fenolik asitler ve flavonoid çekirdekleri için yüksektir. Buradan hidroliz koşullarında bazı fenolik bileşiklerin parçalanması sonucu azaldıklarını ve bazı bileşiklerin ise kullanılan çözücü sistemi ile ekstrakte edilerek alınma oranının düşük olduğunu çıkarabiliriz. Ayrıca sonuçların standart sapmaları göz önüne alınıp değerlendirildiğinde, kateşin ve epikateşin gibi kolay bozulan fenolik bileşikler için ekstraksiyon tekrarlanabilirliğinin düşük olması beklenen bir durumdur. Diğer yandan kuersetinin rutinozid şeker grubuna bağlı bir formu olan rutin hidroliz sonucunda oldukça düşük bir geri kazanıma sahip olması ve diğer yandan kuersetinin yüksek geri kazanımı rutin hidroliz ile şeker grubunu kaybedip kuersetine dönüştüğünü göstermektedir.

Bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımlarına ait hidrolizli ve direkt ekstraktların HPLC-UV ile kantitatif analiz sonuçları Tablo 10'da verildi. Burada hidrolize maruz bırakılan ekstraktlarda rutin azalması, kuersetinin ciddi artışı bitkinin genel olarak kuersetinin rutin dahil çeşitli şeker içeren formlarını ihtiva ettiğini göstermektedir. Kamferolde hidroliz ile nispeten bir artış gözlemlendi ki buda kamferolün de şeker grubu içeren formları ile birlikte bu bitkinin fenoliklerini oluşturduğunu göstermektedir. Hidroliz ile sinamik asitlerden standart kafeik asitin hidrolizli sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre (Tablo 9) geri kazanım değerinin düşük olmasına rağmen, hidrolizli bitki ekstraktlarında ciddi şekilde artışı kafeik asitin çeşitli türevlerinin bitki bileşenlerinin önemli bir kısmını oluşturduğu çıkarıldı.

Bitkinin farklı kısımları karşılaştırıldığında ise kafeik asit yönünden dal kısmının nispeten fakir olması ancak kuersetin ve kamferol açısından daha zengin olması ilgi çekicidir. Çiçek kısmının direkt ekstraksiyonu ile elde edilen HPLC-UV kromatogramı (Şekil.16) ile hidroliz sonucu elde edilen HPLC-UV kromatogramı (Şekil 17) incelendiğinde hidroliz sonucunda tanımlanamayan bileşiklerin miktarlarında ciddi bir azalma gözlenirken, başlangıçta az miktarda olan fenolik bileşiklerin miktarlarının artması, bitkinin fenolik içeriğinin fenolik asit ve flavonoidlerin çeşitli türevlerinden oluştuğunu tekrar net bir şekilde ortaya koymaktadır. Ayrıca bitkinin yaprak ve dal kısımlarının

hidrolizli ekstraktlarının kromatogramlarında da (Şekil 18, Şekil 19) kafeik asit ve kuersetinin hidroliz işlemi sonucunda bitkinin esas fenolik bileşenlerini oluşturdukları gözlemlendi.

Anzer çayının fenoliklerinin kantitatif olarak HPLC-UV ile aydınlatılmaya çalışıldığı bu çalışmada bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımları ayrı ayrı incelendi ve kullanılan 13 fenolik madde standartlarının tümü bitkide az ya da çok miktarlarda gözlemlendi. Optimize edilen HPLC-UV yöntemine göre bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımlarının fenolik bileşiklerden kuersetin ve kafeik asiti daha fazla içerdiği tesbit edildi. Bitkinin kısımlarının farklı ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramlarının profilleri ve elde edilen kantitatif sonuçlar ile birlikte değerlendirildiğinde, genel olarak Anzer çayı bitkisinin fenolik bileşenlerinin sinamik asit ve flavonoid türevlerinden oluştuğu sonucuna varıldı.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisinin fenolik bileşikleri HPLC-UV sistemi ile belirlenmeye çalışıldı.

Fenolik bileşimin belirlenmesinden önce ekstraksiyon koşulları optimize edildi. Ekstraksiyon optimizasyonu HPLC-UV analizlerinin yanısıra spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini ile de değerlendirildi. Hidroliz ile başlayan bitki numunelerinde mevcut standart fenolik madde miktarlarının yüksek olduğu, bunu direkt metanolik bitki ekstraktlarının takip ettiği görüldü. Optimizasyonda uygulanan iki ayrı katı faz ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarları daha az bulundu. Katı faz ile elde edilen ekstraktların HPLC-UV analiz sonuçları değerlendirildiğinde discovery DPA-6S katı fazından elde edilen ekstraktlarda kamferol en yüksek değerde bulunmaktadır. Yine flavonoidler için katı fazların sıvı-sıvı ekstraksiyonu kadar olmasa da yüksek seçicilikte oldukları gözlemlendi. Burada katı faz şartlandırma ve elüsyonu, literatüre dayalı olarak yürütüldüğünden bunun için ayrıca bir yöntem geliştirilmedi ancak uygun katı faz koşulları için de ileri bir optimizasyon çalışması yapılabilir.

Hidrolizli sıvı-sıvı ekstraksiyonu bitkinin çiçek, yaprak ve dal kısımlarına aynı zamanda ve aynı şekilde uygulandı. Bitkinin fenolik içeriğinin tespiti için yeterli ipuçları elde etmek amacıyla, hidrolizsiz olarak doğrudan metanolik ekstraktlar da elde edilerek HPLC-UV ile analiz edildi. Fenolik bileşiklerin HPLC-UV analizleri neticesinde bu bitkinin başlıca sinamik asit ve flavonoid türevlerini ihtiva ettiği belirlendi. Çalışmada HPLC-UV analizlerinden elde edilen sonuçlara göre bitkinin sinamik asitlerden başlıca kafeik asit ve flavonoidlerden ise rutin, kuersetin ve kamferol içerdiği belirlendi. Standartları mevcut olmayan flavonoid ve sinamik asit türevlerinin varlıkları, çeşitli ekstraksiyon yöntemleri sonucunda elde edilen ekstraktların HPLC-UV kromatogramlarından çıkarıldı ancak kesin tanımları mümkün olmadı. Grupları tahmin edilen bu bileşikler ileriki bir çalışma kapsamında HPLC-MS ile karakterize edilebilir ve kromatografi ile izole edilerek NMR, IR, MS ve UV gibi çeşitli yapı aydınlatma yöntemleri ile tanımlanabilirler.

6. KAYNAKLAR

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., Erçağ, E., 2006, The CUPRAC antioxidant capacity and polyphenolics content of some herbal teas, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 57, 292-304.
- Areias F. M., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreres, F., Seabra, R. M., 2001, Phenolic fingerprint of peppermint leaves, Food Chemistry, 73, 307-311.
- Bağci, E. and Başer, K. H. C., 2005, Study of the essential oils of *Thymus haussknechtii* Velen and *Thymus kotschyanus* Boiss. et Hohen var. *kotschyanus* (Lamiaceae) taxa from the eastern Anatolian region in Turkey. Flavour and Fragrance Journal, 20: 199-202.
- Bal Y., 2001, Bitkilerden Etken Madde İzolasyonu ve Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Becchi M. and Fraisse D., 1989. Fast Atom Bombardment and Fast Atom Bombardment Collision-Activated Dissociation/Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Analysis of C-Glycosidic Flavonoids, Biomedical Environmental Mass Spectrometry, 18, 122-130.
- Beltrán J. L., Sanli N. and Fonrodona G., 2003, Spectrophotometric, Potentiometric and Chromatographic pKa Values of Polyphenolic Acids in Water and Acetonitrile-water Media, Analytica Chimica Acta 484, 253-264.
- Blazquez M.A., Manez S. and Zafrapolo M.C., 1994, Further Flavonoids And Other Phenolics Of *Thymus-webbianus* Rouy. Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal Of Biosciences, 49: 687-688.
- Borbalán Á.M.A., Zorro L., Guillén D.A. and Barroso C.G., 2003, Study of Polyphenol Content of Red and White Grape Varieties by Liquid Chromatography- Mass Spectrometry and Its Relationship To Antioxidant Power, Journal Chromatography A, 1012, 31-38.
- Bravo L., 1998, Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutrition Rev., 56, 317-333.
- Cemeroğlu, B. ve Acar, J., 1986, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Ankara.
- Chromotography, 1995, Catalog 350, Alltech Associates, IL, ABD.
- Chun, S., Vattem, D. A., Lin, Y. T., Shetty, K., 2005, Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*, Process Biochemistry, 40, 809-816.

- Cordell G. A., Lemos T. L. G., Monte F. J. Q. and De Mattos M. C., 2007, vegetables as Chemical Reagents, Journal Natural Product, 70, 478-492.
- Corticchiato M., Bernardini A., Costa J., Bayet C., Saunois A. and Voirin B., 1994, Free flavonoid aglycones from *Thymus herba barona* and its monoterpene chemotypes. Chemotaxonomy.
- Cuyckens F. and Claeys M., 2004, Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids, Journal Mass Spectrometry, 39, 1-15.
- Çam, M., Hışıl, Y., 2004, Gıda Flavonoidlerinin Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi ile Analizi, Akademik Gıda Dergisi, 8:22-25.
- Fabre N., Rustan I., Hoffmann D.E. and Quetin-Leclercq J., 2001, Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, Journal Am. Soc. Mass Spectrometry, 12, 707-715.
- Fang Z., Zhang M. and Wang L., 2007, HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of Phenolic Compounds in Bayberries (*Myrica rubra* Sieb.et Zucc.), Food Chemistry, 100, 845-852.
- Harborne, J. B., Marby, T. J., Marby H., 1975, The Flavonoids, Chapman and Hall, London.
- Harborne, J. B. and Marby, T. J., 1982, The Flavonoids: Advances in Research, Chapman and Hall, London.
- Harborne, J. B., 1994, The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, London, UK: Chapman & Hall.
- Harmandar, M., Bilaloglu, G. V., 1999, Flavonoidler, Aktif Yayınevi, 190.
- Henden E., Gökçel İ. , Ertas N., 25-29 Haziran 2001, Eser Analiz Yaz Okulu, İzmir.
- Iqbal, S., Bhanger, M. I., Anwar, F., 2007, Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan, Food Science and Technology, 40, 361-367.
- 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.
- Justesen, U., Knuthsen, P., 2001, Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes, Food Chemistry, 73, 245-250.
- Kähkönen, M.P., Hpiia, A.I., Heikki, J.V., Rauha, J., Pijlaja, K., Kujala, T.S and Heinonen, M., 1999, "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds," Journal Agriculture Food Chemistry, 47, 3954-3962.

- Kalender, Ö.B., 2002, Haşhaş (Papaver Somniferum L.) Tohum Yağı Ekstraksiyonu ve Yağın Kompozisyonunun Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi , Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Karakaya, S., EL, N. S., 1999, Quercetin, luteolin, apigenin and kamferol contents of some foods, Food Chemistry, 66 , 289-292.
- Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., 1998, Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık Ankara.
- Kutlular Ö., 2007, Bazı Adaçayı ve Kekik Türlerinin Uçucu Yağlarının Süper Isıtılmış Su ile Ekstraksiyonları ve GC-MS ile Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Pamukkale.
- List, P. H. and Schmidt, P.C., 2000, Phytopharmaceutical technology, CRC Press, USA.
- Macheix J-J., Fleuriet A. and Billot J., 1990, Fruit Phenolics, USA: CRC Press.
- McCabe L.W., Smith, J.C. and Harriot, P., 1993, Unit Operation of Chemical Engineering, 614-632, New York, USA.
- Mendes E., Proença E.B., Ferraira I.M.P.L.V.O. and Ferraira M.A., 1998, Quality Evaluation of Portuguese Honey. Carbohydrate Polymers, 37: 219-223.
- Nardini M., Natella F., Scaccini C., Ghiselli A., 2005, Phenolic Acids From Beer are Absorbed and Extensively Metabolized in Humans, Journal of Nutritional Biochemistry, 17:14-22
- Orhan I., Şenol F.S., Gülpinar A.R., Kartal M., Şekeroğlu N., Deveci M., Kan Y., Şener B., 2009, Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. Food Chemistry Toxicology, 6:1304-1310.
- Prasain J.K., Wang C-C. ve Barnes S., 2004, Mass Spectrometric Methods for the Determination of Flavonoids in Biological Samples, Free Radical Biology and Medical, 37, 1324-1350.
- Robbins R. J., 2003, Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, Journal of Agricultural Food Chemistry 51:2866-2887.
- Ryzsnyak S. and Szent-Greorgy, A, 1936, Vitamin P: Flavonols as Vitamins, Nature, 138, 27.
- Schuster B. and Herrmann K., 1985, Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Soft Fruits, Phytochemical, 24, 2761-2764.
- SGE Chromatography Products, 2001, SGE Europe Ltd, U.K.
- Shahidi, F., Naczki, M., 2003, Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Press LLC, ABD, 1-14.

- Shi, J., Mazza, G. and Maguer, M.L., 2002, Functional Foods Biochemical and Processing Aspects Volume2 (Ed: Skrede G. ve Wrolstad R.E), CRC Press, 73-74.
- Shing, R.K, Rivzi, S.H., 1995, "Bioseparation process in foods," Basic Symposium Series, Marcel Dekker, Inc.
- Skoog D.A., James Holler F. and Nieman T.A., 1998, Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Saunders College Publishing, US, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Skoog D.A., Holler F.H. and Crouch S.R., 2007, Principles of Instrumental Analysis, Thompson Brooks, 17-21.
- Smith D. A., Banks, S. W., 1986, Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationship, 113-124.
- Sökmen A., Gulluce M., Akpulat H. A., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. and Sahin F., 2004, The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and metanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Food Control, 15: 627–634.
- Spacil Z., Novakov L. and Solich P., 2008, Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography, Talanta, 76 189-199.
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H., Sun, M., 2007, Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants, Food Chemistry, 102, 938-953.
- Swain, T., 1975, The Flavonoids, Chapman and Hall., (Eds.Harborne, J. B., Marby, T. J., Marby, M.) 109.
- Tepe B., Sökmen M. Akpulat H. A., Daferera D., Polissiou M. and Sökmen A., 2005, Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. Journal of Food Engineering, 66: 447–454.
- Toker, G., Aslan, M., Yesilada, E., Memişoğlu, M., ITO, S., 2001, Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 26, 111–121.
- Tomruk, E., 2005, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi için Hidrofilik Destek Materyal_Sentez ve Kromatografik Karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Training methodologies in Metrology in Chemistry, 22-24 February 2011, Trabzon.
- Urbonaviciute, A., Jakstas, V., Kornysova, O., Janulis, V., Maruska, A., 2006, Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in singlestyle hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts, Journal of Chromatography A, 1112, 339-344.

- Uyan C., 2007, Ayırma ve Zenginleştirme Yöntemleri Ders Notları, Cumhuriyet Üniversitesi, s.27-28.
- Vermerris W. and Nicholson R., 2006, Phenolic Compound Biochemistry, Springer, 276
- Wan P.J., Wakelyn, P.J., 1997, Technology and Solvents for Extracting Oilseed and Nonpetroleum Oils, AOCS Pressure.
- Wollgast J. and Anklam E., 2000, Rewiew on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Research, 33, 423-447.
- Yıldız L., 2007, Bazı Bitki Örneklerinde Antioksidan Kapasitenin Spektrofotometrik ve Kromatografik Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

22.01.1984 Tarihinde Rize’de doğdu. İlkokul ve ortaokulu Çay İlköğretim Okulunda ve liseyi Fener Lisesinde okudu. 2003 Yılında kazandığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. 2007 Yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde Yüksek Lisans Eğitimine başladı ve bir dönem sonra Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne geçiş yaparak yüksek lisans eğitimini devam ettirdi. Orta derecede İngilizce bilmektedir.