

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

Polygonum bistorta ssp. *carneum* BİTKİ EKSTRAKTLARININ
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE KİMYASAL BİLEŞİMİNİN
BELİRLENMESİ VE ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Emine AKYÜZ

**OCAK 2007
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Polygonum bistorta ssp. carneum* BİTKİ EKSTRAKTLARININ KROMATOĞRAFİK
YÖNTEMLERLE KİMYASAL BİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİOKSİDAN
VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ**

Kimyager Emine AKYÜZ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans Kimya”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26.12.2006

Tezin Savunma Tarihi : 15.01.2007

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Birgül VANİZOR KURAL

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

TRABZON 2007

ÖNSÖZ

'*Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri' adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Sayın danışmanım Doç. Dr. Murat KÜÇÜK'e bu çalışmada sürekli destek ve yardımlarını benden esirgemediği için teşekkür etmek isterim.

Bu projede bana danışmanlık sunan Prof. Dr. Patrick SANDRA'ya bana yol gösterdiği ve Belçika'da Ghent Üniversitesi Kimya Bölümündeki laboratuvarının imkanlarını kullanma fırsatını sağladığı için teşekkür etmek isterim.

Çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm ve gerekli madde ve malzemeleri temin ettiğim KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde başta Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Nurettin YAYLI olmak üzere Hocalarım Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI ve Doç. Dr. Ümmühan OCAK'a, tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve laboratuvar arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Araştırma Görevlisi olarak çalışmakta olduğum Rize Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU'na çalışmalarımı yürütebilmem için sağladığı her türlü imkandan dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca Ghent Üniversitesi'ndeki çalışmam boyunca sürekli rehberliği ve desteklerinden dolayı özellikle André De VILLIERS'a, tezin yazımında yardımlarını esirgemeyen Frediric LYNEN ve Els VANHOECK'a ve Prof. Dr. Patrick SANDRA'nın danışmanlığında çalışan takımın tüm üyelerine dostça yakınlıkları için teşekkür etmek isterim.

Son olarak aileme ve özellikle anneme bugüne kadar benim için yaptıkları her şey için teşekkür etmek isterim.

Emine AKYÜZ

Trabzon, 2007

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar.....	2
1.3. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler	8
1.3.1. Fenolik Bileşikler	8
1.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	12
1.4.1. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi	12
1.4.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi.....	13
1.4.3. Tiyosiyanat Metodu.....	13
1.4.4. Floresans Sönme Zamanı Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini	14
1.4.5. Toplam Fenolik Madde Tayini	14
1.4.6. Toplam Antioksidan Güç (TAR) Tayin Metodu	14
1.4.7. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi	15
1.4.8. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi.....	15
1.4.9. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi.....	16
1.5. Antimikrobiyal Maddeler.....	16
1.5.1. Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri.....	17
1.5.2. Antibakteriyel Maddenin Sınıflandırılması.....	18
1.5.3. Antibiyotiklere Duyarlılık Deneyleri.....	18
1.6. Bitki Bileşenlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	19
1.6.1. Modern Kromatografik Yöntemler.....	19
1.6.1.1. Gaz Kromatografisi	20

1.6.1.1.1. Kütle Spektrometrik Dedektör.....	22
1.6.1.2. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi	23
1.6.1.2.1. Ultraviyole Dedektör	25
1.6.1.2.2. Kütle Spektrometrik Dedektör.....	27
1.7. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> Bitkisinin Özellikleri.....	30
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
2.1. Bitkinin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması	31
2.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonu	31
2.1.2. Sulu Ekstraktların Hazırlanması.....	32
2.1.3. Döner Vakum Evaporatörü ile Çözücü Uçurulması.....	33
2.2. Kimyasal Analiz	34
2.2.1. Kloroform Ekstraktlarının GC-MS ile Analizleri.....	34
2.2.1.1. Giriş	34
2.2.1.2. Materyal ve Metotlar	34
2.2.1.3. GC-MS Koşulları.....	34
2.2.2. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin Analizi	34
2.2.2.1. Materyaller	34
2.2.2.2. Hidroliz.....	35
2.2.2.3. Standartlar ve Kalibrasyon	35
2.2.2.4. LC-UV Koşulları	35
2.2.2.5. LC-UV İçin Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi	36
2.2.2.6. LC-MS Koşulları.....	36
2.2.3. Antioksidan Aktivite.....	37
2.2.3.1. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi	37
2.2.3.2. IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	37
2.2.4. Antimikrobiyal Aktivite	37
2.2.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi	38
2.2.4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Yöntemi	38
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	40
3.1. Kloroform Ekstraktları İçin Elde Edilen Kromatogramlar.....	40
3.2. Fenolik Bileşikler	42
3.2.1. LC-UV Metot Geliştirme	42

3.2.2.	<i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> Metanolik Ekstraktlarının LC-UV Analizleri	44
3.2.3.	Çarpışmadan Kaynaklanan Ayrışma ile LC-MS Tarafından Glikozidik Flavonoidlerin Tanımlanması	47
3.2.3.1.	Heksozlar	48
3.2.3.2.	Pentozlar	49
3.2.3.3.	Deoksiheksozlar	50
3.2.3.4.	Diheksozlar	51
3.2.3.5.	Deoksiheksoz + Heksoz	51
3.2.3.6.	Heksoz + Pentozlar	52
3.2.3.7.	Heksoz + CH ₃	52
3.2.4.	MS ve Uygun Standartlarla Karşılaştırarak İlave Flavonoidlerin Tanımlanması	53
3.2.4.1.	Gallik asit	53
3.2.4.2.	Protokatekuik asit	54
3.2.4.3.	Kateşin	55
3.2.4.4.	Epikateşin	55
3.2.4.5.	Rutin	56
3.2.4.6.	Kuersetin	56
3.2.5.	Yalnızca Kütle Spektrometresi Tarafından İlave Flavonoidlerin Tanımlanması	58
3.2.5.1.	Klorogenik asit	58
3.2.5.2.	Prosiyanidin dimer	59
3.2.5.3.	İsorhamnetin-deoksiheksoz + heksoz	60
3.2.5.4.	İsorhamnetin-heksoz + pentoz	61
3.2.5.5.	Apigenin-heksoz	62
3.3.	Antioksidan Aktivite : DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri	65
3.4.	Antimikrobiyal Aktiviteler	71
3.4.1.	Agar Kuyucuk Testi	71
3.4.2.	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Testi	71
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	73
5.	KAYNAKLAR	75
	ÖZGEÇMİŞ	80

ÖZET

Antioksidanlar, birçok biyomolekülle kolayca etkileşerek zarar verebilen serbest radikalleri etkisiz hale getirerek, birçok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları önlerler. Bu çalışmada amacımız öncelikle endemik bir bitki olan *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un metanol, kloroform ve sulu ekstraktlarının antioksidan karakterini incelemek ve bu etkide önemli rol oynayan fenolik bileşiklerini belirlemektir. Bitki halk arasında birçok hastalık için faydalı olarak bilinen Anzer balının üretildiği Anzer yaylasından toplanmıştır. Bitkinin ekstraktlarının DPPH radikal temizleme aktiviteleri standart antioksidanlar kateşin, BHT, Troloks® ve askorbik asit ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Ekstraktlar aynı zamanda antimikrobiyal aktivite açısından da incelendi.

Bitkinin kimyasal bileşimini kapsayan çalışma Belçika'da Ghent Üniversitesi'nde yapıldı. Bu çalışmada metanolik ekstraktlarda 12 fenolik standart kullanılarak RP-LC-DAD ile analiz yapıldı. Ekstraktların her birinde oldukça farklı profiller elde edildi. LC-MS-ESI yöntemi mevcut olan fenolik bileşiklerin aydınlatılması için kullanıldı.

P. bistorta ssp. *carneum*'un metanolik ekstraktlarında bulunan fenolik bileşikler, standartlar ve literatürde rapor edilen alıkonma zamanı ve kütle spektrumları ile karşılaştırılarak tanımlandı. Sonuç olarak metanolik ekstraktlarda gallik asit, protokatekuik asit, klorogenik asit, prosiyanidin dimer, kateşin, epikateşin, isorhamnetin, kamferol, apigenin, kuersetin flavonoidler ve ayrıca glikozidik-isorhamnetin, kamferol, apigenin ve kuersetin flavonoidler mevcut metoda göre gözlemlendi.

Bitkinin kloroform ekstraktları CGC-MS ile analiz edildi. Ekstraktlarda bazı terpenler, aldehidler, karboksilik asitler, ketonlar ve alkoller gözlemlendi.

Metanol ve sulu ekstraktların antioksidan aktivitesi daha yüksek bulunurken, sadece kloroform ekstraktlarında önemli derecede antimikrobiyal aktivite gözlemlendi.

Mevcut çalışmada elde edilen tüm sonuçlar bitki ekstraktlarının antioksidan aktivite açısından önemli olan fenolik asitler ve flavonoidlerce zengin olduğunu ve yapılan antioksidan test sonuçlarını ve meşhur Anzer balının faydalarını doğrulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*, antioksidan, antimikrobiyal, fenolik.

SUMMARY

The Determination of Chemical Composition of *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Extracts by Chromatographic Methods and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities

Antioxidants, by scavenging free radicals interacting with and easily modifying many biomolecules, prevent chain reactions resulting in many diseases including early aging. The aim of the current study was to investigate the antioxidant activity of methanolic, chloroform and aqueous extracts of *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* and to determine chemical composition. The plant was collected from Anzer Plateau, well-known with its famous Anzer honey with many health benefits. The antioxidant activities of the extracts were evaluated with DPPH radical scavenging activity test comparing with standards catechin, BHT, Trolox® and ascorbic acid. The extracts were also tested for antimicrobial properties.

The chemical composition of the extracts was studied in Ghent University in Belgium. The methanolic extracts were analyzed with RP-LC-DAD by using 12 phenolic standards. The extracts revealed quite variable phenolic profiles. LC-MS-ESI method was used to identify phenolics.

The phenolic components of the extracts were identified based on comparison of retention times and mass spectra of standards and literature data. The following compounds were observed in the methanolic extracts: gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, procyanidin dimer, catechin, epicatechin, isorhamnetin, kaempferol, apigenin, and quercetin.

The chloroform extracts were analyzed with CGC-MS method and found to contain terpenes, aldehydes, carboxylic acids, ketones, and alcohols.

While methanolic and aqueous extracts showed better antioxidant activity, only the chloroform extracts had antibacterial and antifungal activity against test microorganisms.

The results confirmed the antioxidant rich composition of this Anzer plant with phenolic acids and flavonoids and good antioxidant character, as well as benefits of Anzer honey.

Keywords: *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*, antioxidant, antimicrobial, phenolic.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Diyetlerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları	10
Şekil 2. Kuersetin-3-O-β-rutinozit (rutin)'in yapısı	11
Şekil 3. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu	13
Şekil 4. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü	15
Şekil 5. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS ^{•+}) radikalinin formülü	16
Şekil 6. Genel bir Gaz Kromatografi sistemi	20
Şekil 7. Bir kuadropol kütle analizörünün şematik diyagramı	22
Şekil 8. Diyot serili dedektörün (DAD) şematik diyagramı	26
Şekil 9. Bir HPLC-MS enstrümanının yapısı	27
Şekil 10. Bir elektrosprey iyon kaynağının şematik diyagramı	28
Şekil 11. Bir iyon tuzak detektörün şematik diyagramı	29
Şekil 12. Soxhlet aparatı	31
Şekil 13. Döner buharlaştırma düzeneği	33
Şekil 14. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un (numune 110YK) yaprak ekstraktlarının GC-MS kromatogramları	40
Şekil 15. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un (numune 110CK) çiçek ekstraktlarının GC-MS kromatogramları	40
Şekil 16. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un (numune 110SK) sap ekstraktlarının GC-MS kromatogramları	41
Şekil 17. LC-DAD tarafından 280 nm (a), 315 nm (b) ve 370 nm (c)' de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar	43
Şekil 18. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un metanolik yaprak ekstraktlarının (a) 280 nm, (b) 315 nm ve (c) 370 nm'deki kromatogramları	45
Şekil 19. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un metanolik çiçek ekstraktlarının (a) 280 nm, (b) 315 nm ve (c) 370 nm'deki kromatogramları	45
Şekil 20. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un metanolik sap ekstraktlarının (a) 280 nm, (b) 315 nm ve (c) 370 nm'deki kromatogramları	46
Şekil 21. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un hidrolizlenmiş yaprak (a), çiçek, (b) ve sap (c) ekstraktlarının 370 nm'de elde edilen kromatogramları	46

Şekil 22.	<i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> yapraklarının ekstraktları için hidrolizden önce 370 nm’de elde edilen kromatogramlar	47
Şekil 23.	Kuersetin-heksozun %50 çarpışmadan kaynaklanan ayrışma ile elde edilen kütle spektrumu	49
Şekil 24.	Kuersetin-pentozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu	49
Şekil 25.	Kuersetin-deoksiheksozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu	50
Şekil 26.	Kuersetin-diheksozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu	51
Şekil 27.	Kamferol-deoksiheksoz+heksozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu	51
Şekil 28.	Kuersetin-heksoz+pentozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu	52
Şekil 29.	Kuersetin-heksoz+CH ₃ ’ün %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu	53
Şekil 30.	Gallik asitin CID’siz kütle spektrumu	54
Şekil 31.	Protokatekuik asitin CID’siz kütle spektrumu	54
Şekil 32.	Kateşinin CID’siz kütle spektrumu	55
Şekil 33.	Epikateşinin CID’siz kütle spektrumu	55
Şekil 34.	Rutin’in CID ile elde edilen kütle spektrumu	56
Şekil 35.	Kuersetin’in CID ile elde edilen kütle spektrumu	57
Şekil 36.	Klorojenik asidin CID’siz kütle spektrumu	59
Şekil 37.	<i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> ’un yaprak ekstraktlarında gözlenen klorojenik asit (m/z 353 akb) için ekstrakte iyon kromatogramı	59
Şekil 38.	Prosiyanidin dimerin CID uygulanmaksızın elde edilen kütle spektrumu ...	60
Şekil 39.	İsorhamnetin-deoksiheksoz+heksozun %50 CID uygulanarak elde edilen kütle spektrumu	60
Şekil 40.	<i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> ’un çiçek ekstraktlarında gözlenen isorhamnetin (623 akb) için ekstrakte edilen iyon kromatogramı	61
Şekil 41.	İsorhamnetin-heksoz+pentozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu .	61
Şekil 42.	Apigenin-heksozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu	62
Şekil 43.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> ’un yaprak kısmının kloroform ekstraktının (110YK) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	65
Şekil 44.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> ’un çiçek kısmının kloroform ekstraktının (110CK) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	66
Şekil 45.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> ’un sap kısmının kloroform ekstraktının (110SK) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	66
Şekil 46.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> ’un yaprak kısmının metanol ekstraktının (110YM) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	67

Şekil 47.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un çiçek kısmının metanol ekstraktının (110CM) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	67
Şekil 48.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un sap kısmının metanol ekstraktının (110SM) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	68
Şekil 49.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un yaprak kısmının sulu ekstraktının (110YS) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	68
Şekil 50.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un çiçek kısmının sulu ekstraktının (110CS) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	69
Şekil 51.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un sap kısmının sulu ekstraktının (110SS) DPPH• radikali temizleme aktivitesi	69
Şekil 52.	<i>P. bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> 'un yaprak (Y), çiçek (C) ve sap (S) kısımlarının kloroform (K), metanol (M) ve sulu (S) ekstraktlarının DPPH• radikali temizleme aktiviteleri	70

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri	3
Tablo 2. Kloroform ve metanol ekstraktlarının belirlenen konsantrasyonları	32
Tablo 3. Su ekstraktlarının belirlenen konsantrasyonları	33
Tablo 4. Tüm ekstraktlarda GC-MS tarafından tanımlanan bileşikler	41
Tablo 5. Geliştirilen LC-DAD metodunun parametreleri	43
Tablo 6. <i>Polygonum bistorta</i> ssp. <i>carneum</i> hidroliz edilmeyen yaprak ekstraktlarının ESI- MS ile çarpışma kaynaklı ayrışma sayesinde tespit edilen moleküler iyon ($[M-H]^-$) m/z değerleri ve başlıca fragmentler	48
Tablo 7. Hidroliz olmayan ekstraktlarda flavonoidlerin $[M-H]^-$ iyonlarının m/z değerlerinin tanımlanması	57
Tablo 8. Bitki ekstraktlarında tespit edilen fenolik bileşikler	63
Tablo 9. Metanol ve sulu ekstraktların antimikrobiyal aktivite tayini sonuçları	71
Tablo 10. Kloroform ekstraktları antimikrobiyal aktivite tayini sonuçları	72

SEMBOLLER DİZİNİ

AcOH	: Asetik asit
APCI	: Atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma
API	: Atmosferik basınç İyonlaştırma
C18	: Oktadesil
C ₆ H ₅ O ⁻	: Fenolat anyonu
C8	: Oktil
CGC	: Kapiler Gaz Kromatografisi
CGC-MS	: Kapiler Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi
CH ₃ CN, ACN	: Asetonitril
CI	: Kimyasal İyonlaştırma
CID	: Çarpışmadan kaynaklanan ayrışma
DAD	: Diyot Serili Dedektör
DC	: Doğru akım voltajı
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ECD	: Elektron Yakalama Dedektör
EI	: Elektron İmpakt İyonlaştırma
ESI	: Elektrosprey iyonlaştırma
ESI-MS	: Elektrosprey İyonlaştırma- Kütle Spektrometrisi
FID	: Alev İyonlaşma Dedektörü
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
HCl	: Hidroklorik Asit
HCOOH	: Formik Asit
He	: Helyum
HPLC	: Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	: Yüksek-Performanslı Sıvı kromatografisi-kütle spektrometri
IC ₅₀	: %50 İnhibisyon konsantrasyonu
kV	: Kilo Volt
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-DAD	: Sıvı Kromatografisi- Diyot Serili Dedektör
LC-ESI-MS	: Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonlaştırma- Kütle Spektrometrisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
LOD	: Dedeksiyon limiti
MDA	: Malondialdehit
MeOH	: Metanol
MS	: Kütle Spektrometrik Dedektör
N ₂	: Azot
NP	: Normal faz
OH	: Hidroksil
ppm	: Milyonda kısım
PTV	: Sıcaklık programlı buharlaşma
PVDF	: Polivinil diflorür
RF	: Radyo frekansı
RP	: Ters faz

RP-LC	: Ters Faz- Sıvı Kromatografisi
RP-LC-DAD	: Ters Faz- Sıvı Kromatografisi- Diyot Serili Dedektör
RSD	: Bağlı standart sapma
SIM	: Tek iyon izleyen (Single ion Monitorization)
TFA	: Trifloroasetik asit
TOF	: Uçuş-Zamanlı Kütle Analizörü
UV	: Ultraviyole
UV-VIS	: Ultraviyole- Görünür Bölge
V	: Volt
VIS	: Görünür

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Canlı organizmanın serbest radikallerin etkisinden korunması için antioksidatif korunma sistemine sahip olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı, serbest radikallerin vücutta fazlalaştığı görülür. Antioksidanlar, hücreye zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girerek bunların başlattığı zincir reaksiyonu durduran ve böylece vücudumuzdaki hayati bileşenlerin zarar görmesini engelleyen moleküllerdir. Son yıllarda sentetik antioksidanların yan etkilerinin görülmeye başlaması nedeniyle besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara ilgisi artmıştır. Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar (Rice-Evans vd., 1997). En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinnamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Eski zamanlarda çiçek, bitki ve ballar ilaç olarak kullanılırdı. Tüm ballar yapılarından dolayı (anti-oksidan ve anti-bakteriyel v.b.) insan vücudu üzerinde pozitif etkiye sahiptirler. Arıların buldukları ortamın florası balın içeriği açısından oldukça önemli bir faktördür. Bu faktöre bölgesel özellikler ve iklim koşullarının da etkisi büyüktür (Mendes vd., 1998).

Anadolu'nun kuzey-doğusunda yer alan Anzer bölgesi özellikle bu bölgeden elde edilen Anzer balıyla Türkiye'de çok meşhurdur. Anzer balının diğer ballardan daha fazla sağlık faydaları olduğuna inanılmaktadır ve bal üreticileri hepatit B gibi pek çok hastalığa karşı tedavi edici olduğunu ifade etmektedirler. Anzer balının sağlık açısından faydalarının onun 60 endemik tür içeren 500 farklı çiçeğe sahip floral orijiniyle alakalı olduğu düşünülmektedir (URL-1, 2006).

Anzer balının kompozisyonu kısmen bal arıları tarafından ziyaret edilen bitkilerden türevlenmiştir. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Anzer balının floral karakterini belirlediği düşünülen endemik bitkilerden biridir.

Anzer balının eşsiz özelliklerini belirlemede bitkinin potansiyel rolünden dolayı *P. bistorta* ssp. *carneum*'un kimyasal karakterizasyonu ticari olarak da önemlidir. Mevcut çalışmada Anzer yaylasından toplanan *P. bistorta* ssp. *carneum* bitkisinin ekstraktlarının ve esansiyel yağlarının içeriğinin yanı sıra fenolik bileşik içeriği de araştırıldı. Bu çalışmada aynı zamanda ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri incelendi.

1.2. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Oksijen metabolik yolların birincil oksidan molekülüdür. Oksidatif stres oksijen kullanan metabolik yollardan kaynaklanmaktadır ve pro-oksidan / anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması neticesinde ortaya çıkmaktadır. Pro-oksidan sistem anti-oksidan sisteme baskın geldiğinde yani fazla miktarda oksidan bileşen üretildiğinde oksidatif stres meydana gelmektedir. Bu durum genellikle radyasyona maruz kalındığında, çevresel kirleticilerin ve ilaçların metabolize edilmesi sırasında ve bir hastalık ya da enfeksiyona karşı bağışıklık sistemi cevabı oluştuğunda ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak ta birçok biyomolekül hasar görmektedir. Karbohidratlar oksidatif stres ürünleri olan serbest radikallerle reaksiyon vererek karbon merkezli radikallere dönüşmektedirler. Hidroksil radikali nükleik asitlerin yapısındaki pentozfosfat yapıya saldırmakta ve değişikliklere sebep olmaktadır. Son yıllarda nükleik asit yapısında 8-hidroksi guanozin tespit edilmesi oksidatif hasarın bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Proteinler de oksidatif stresten hasar görmekte, çoğunlukla tirozin, metiyonin, prolin, histidin, fenil alanin ve triptofan birimleri değişikliğe uğramaktadır. Lipidler oksidatif stres neticesinde peroksidasyona maruz kalmakta ve sonuçta membranların yapı ve fonksiyonları etkilenmektedir. Malondialdehit (MDA) lipidlerin radikalik saldırı sonucu oluşturduğu bir üründür ve birçok araştırma da oksidatif stresin ya da antioksidan statünün bir göstergesi olarak miktarı belirlenmektedir.

Serbest radikaller iyonların veya uyarılmış moleküllerinin ayrılmaları sonucunda oluşan, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Bunların yaklaşık 10^{-5} s gibi bir ömürleri bulunmaktadır. Serbest radikaller son derece reaktiftirler, yani diğer atom ya da moleküllerle kolayca reaksiyona girerler.

Serbest radikallerin normal metabolizmaya ait bir ürün olduğu sonradan anlaşılmış ve günümüzde radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı iyi bilinmekte olup yaşlanma, hücre hasar ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir (Storz ve Imlayt, 1999). Serbest radikallerin başlıca sigara, alkol ve lipit metabolizması ürünleri, virüsler, güneş ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve havadan da oluşabildiği bilinmektedir (Sies, 1991). Aynı zamanda serbest radikaller aktive olmuş fagositler, antineoplastikler (nitro furantoin, bleomisin, doksorubusin, adriamisin) ve stres

(katekolamin artar - katekolamin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelir) sonucu biyolojik olarak üretilir. Bugün serbest radikaller kanser, yaşlanma, Alzeheimer, ateroskleroz gibi pek çok hastalığın oluşmasından sorumlu ajanlar olarak ele alınmaktadır.

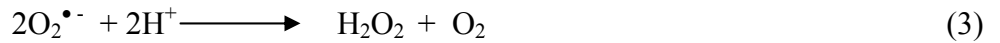
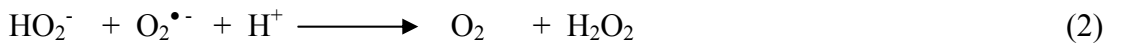
Radikaller, oksijen içerip içermediğine göre, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve oksijen içermeyen radikaller olarak ikiye ayrılır (Dündar ve Aslan, 2000). İçerdiği iki eşleşmemiş elektrondan dolayı moleküler oksijenin kendisi de aynı zamanda “biradikal” olup diğer radikallerle kolayca reaksiyon verebilme yeteneğine sahiptir. Moleküler oksijen organizmalar için indirgenmiş karbon bileşiklerinin oksidasyonunda enerji oluşturmak üzere kullanılan en son elektron alıcısı olup tam olarak suya indirgenebilmesi için dört elektrona ihtiyaç duymaktadır. Biyolojik sistemlerde sıklıkla oluşabilen serbest oksijen radikalleri Tablo 1’de verilmektedir.

Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri

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

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin çoğunluğunu serbest oksijen radikalleri oluşturur. Bunların büyük kısmı aerobik solunum sırasında mitokondrilerde indirgenmiş karbon birimlerinden alınan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılardan geçerek en son elektron alıcısı olan moleküler oksijene transferi esnasında meydana gelir. Oksijenin tam olarak indirgenmediği reaksiyonlarda son ürün daima sudur. Oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu serbest oksijen radikalleri oluşur. Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), iki elektron almasıyla hidrojen peroksit (H_2O_2), üç elektron almasıyla ise hidroksil (OH^{\bullet}) radikali oluşmaktadır (Winston, 1991; Matés vd., 1999).

Süperoksit (O_2^-), moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelen radikal olup, daha çok $O_2^{\bullet-}$ veya O_2^- anyonu şeklinde gösterilir. Süperoksit radikali aerobik hücrelerde oldukça sık oluşur. Fakat daha çok elektron transfer sistemlerinde meydana gelir. Bunun yanında pek çok enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir (Halliwell vd., 1992). Süperoksit radikali, diğer radikallere nazaran daha az toksik etkiye sahiptir ve yüklü olduğu için hücre membranından doğrudan geçemez. Ancak eritrosit membranlarındaki anyon kanalından geçebilir. Anyon kanalından Cl^- ve HCO_3^- iyonlarının yer değiştirmesiyle geçebilmektedir. Süperoksit radikalının esas zararlı etkisi onun protonlanmasıyla meydana gelmektedir. Protonlanma ile çok daha aktif bir radikal olan perhidroksil radikali (HO_2^-) meydana gelir. Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girdiklerinde biri yükseltgenirken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucunda da oksijen molekülü ve hidrojen peroksit meydana gelir. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (Fridovich, 1975).



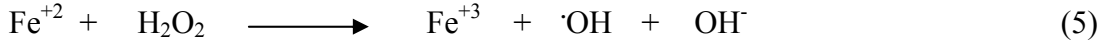
Hidrojen peroksit bir radikal olmadığı halde doğrudan çeşitli radikallerin oluşumunda önemli bir rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur (4).



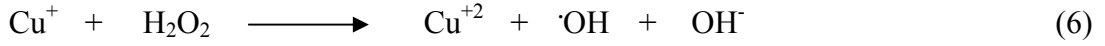
Hidroksil radikali ($\bullet OH$), SOR türlerinin en reaktif olanıdır ve bilinen en etkili oksidandır. Bu radikal, hücrelerde mevcut olan tüm organik yapılara saldırabilme yeteneğine sahiptir. Hidroksil radikali iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle de oluşturulabilir

ve muhtemelen x-ışını ve γ -ışınlarıyla hücrelerin ölmesine sebep olan en temel türlerden biridir. Bu radikal kimyasal olarak süperoksit ve peroksit radikalleri arasındaki reaksiyonla da üretilebilir. Dolayısıyla süperoksit ve peroksitin aynı anda üretildiği canlı sistemlerde hidroksil radikalının biyokimyasal oluşumu da mümkündür.

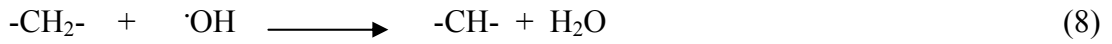
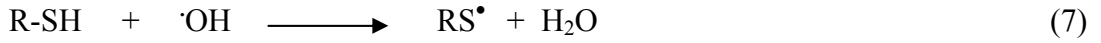
H_2O_2 'deki O-O bağının homolitik parçalanması iki hidroksil radikali verir. Homoliz ısıyla ya da iyonize edici reaksiyonla (ışıkla) gerçekleştirilir. H_2O_2 ve Fe (II) tuzunun karışımı hidroksil radikalini verir (5)



Bakır (I) tuzları, Fe (II) tuzlarına göre çok daha hızlı olarak hidroksil radikalleri vermek üzere H_2O_2 ile reaksiyona girer (6).



Hidroksil radikalının reaktivitesi oldukça yüksek ve yarılanma ömürleri çok kısadır. Canlı sistemlerde oluştuğu anda yakınlarındaki biyolojik molekül ile derhal reaksiyona girerler. Proteinlerde sülfhidril gurupları (7) ve yağ asitleri (8) bu radikallerin etkisinde kaldıklarında çeşitli reaktiviteye sahip ikincil radikaller verirler.



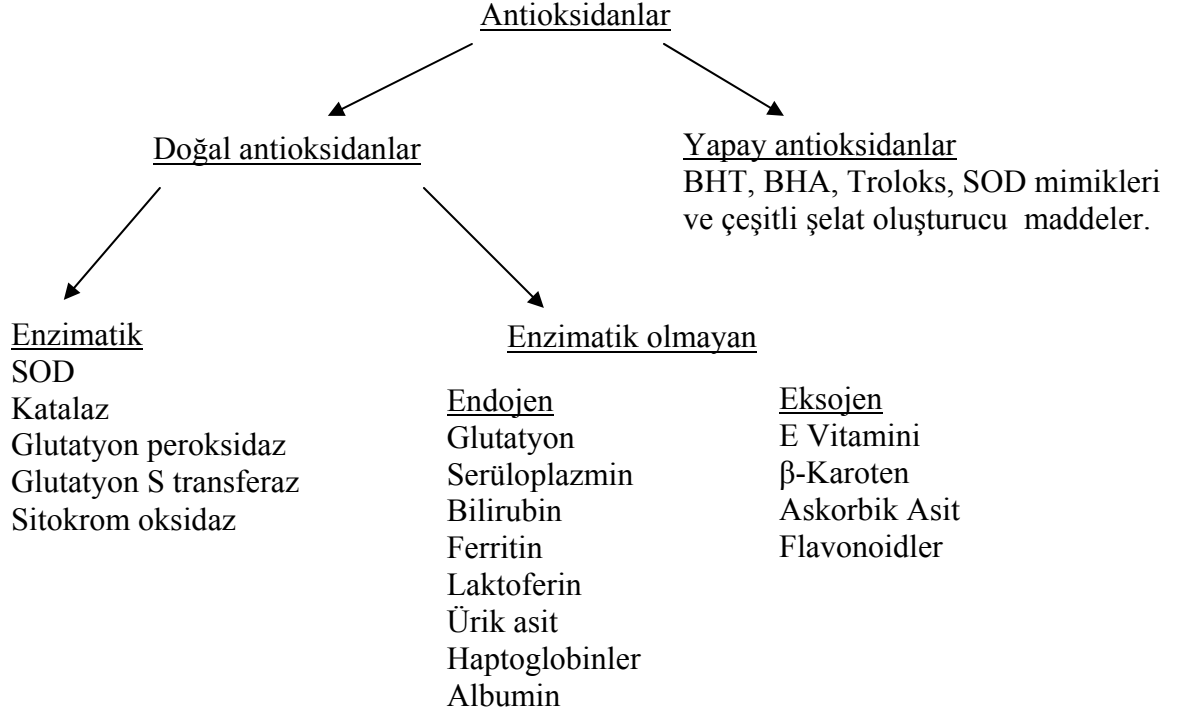
Serbest radikaller ve reaktif bileşikler oksidan veya prooksidan olarak tanımlanır. Bir canlıdaki oksidan maddelerden kaynaklanan oksidan düzeyi ise “oksidan statü” altında değerlendirilmektedir. Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonları inhibe eden bir sisteme sahiptir. Radikallerle oldukça çabuk reaksiyonlara girerek oto-oksidasyon veya peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler ise antioksidan olarak tanımlanırlar.

Antioksidan savunma çeşitli mekanizmalarla etkisini göstermektedir. Bu mekanizmalar:

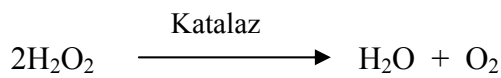
1. Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
2. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (radikallerin detoksifikasyonu)
3. Hücre deformasyonunun onarılması
4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması
5. Endojen antioksidan kapasitesinin artırılması

Antioksidanlar doğal ve yapay antioksidanlar olarak ikiye ayrılırken doğal antioksidanlar enzimatik etki gösteren ve enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Enzimatik etki göstermeyen antioksidanlar ise endojen ve eksojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılabilir. Endojen antioksidanlar buldukları ve etkinliklerini

yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi (intraselüler), membranal ve hücre dışı (ekstraselüler) antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilir.



Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit radikallerinin dismutasyonundan sorumlu, glutatyon peroksidaz (GPx) hücre içinde düşük konsantrasyonda oluşan peroksit ürünlerinin (R_2O_2) dismutasyonundan ve katalaz (KAT) ise yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin (H_2O_2) dismutasyonundan sorumlu birer enzimatik antioksidan olup etkinliklerini hücre içinde gösterirler (Mates, 1999; Halliwell vd., 1992). Örneğin dört hem grubu bulunan bir hemoprotein olan ve her alt birimin molekül ağırlığı 60 kDa olan katalaz, aerobik solunum veya başka yollarla oluşan hidrojen peroksiti oksijen ve suya dönüştürerek zararlı etkisinden organizmayı korur. Katalaz, hidrojen peroksit, metil etil hidroperoksitleri küçük molekül ağırlıklı molekülleri etkilerken büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerini etkilemez (Mates, 1999).



Glutatyon, bilirubin, radikal tutucu özelliği ile ürik asit, albumin, bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları sınırlayan seruloplazmin, hemoglobin, ferritin birer

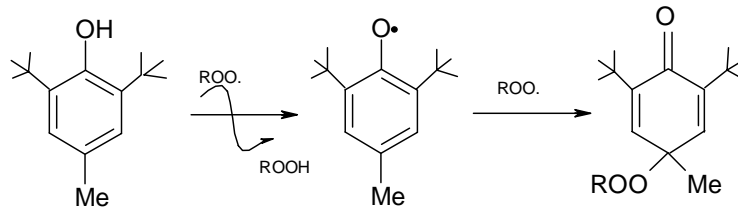
endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlardır (Meister ve Anderson, 1983; Dündar ve Aslan, 2000).

Süperoksit radikali dışındaki diğer bir indirgeyici hücrenel ajan olan askorbik asit (C vitamini), zincir kırıcı antioksidan etki gösteren α -tokoferol (E vitamini), radikal toplayıcı etkisi bulunan β -karoten (vitamin A) ve polifenoller gibi moleküller insan ve hayvan organizmasında sentezlenemeyen bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen maddeler olup radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında etkili birer antioksidan maddelerdir ve etkinliklerini enzimatik olmayan yolla sürdürürler (Chen vd., 1988; Edge vd., 1997).

Nitrik oksit ile süperoksidin reaksiyon ürünü olan peroksinitrit çok kısa yarı ömürlü ancak oksidatif doku hasarına neden olan son derece reaktif bir moleküldür. Peroksinitritin zararlı etkilerinin engellenmesinde rol oynayan, organizmada bulunan ya da dışarıdan alınan birçok antioksidan bileşik mevcuttur (Konda vd., 1997; Heijnen vd., 2000). Seleno bileşikler, flavanoidler, katekinler, hidroksiguanidinler, metalotiyonein, indirgenmiş nikotinamid nükleotitleri ve ürik asit peroksinitriti temizleme aktivitesi üzerine çalışma yapılmış bileşiklerdir. Bazı bileşiklerde peroksi nitriti ortadan kaldırmadan ziyade, peroksinitritin gerçekleştirdiği değişikliklerin geri dönüşümü sağlamaktadır.

Süperoksit anyonunun temizlenmesinde en etkili antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi olup glutatyon, flavonoidler ve çeşitli polifenoller de etkin rol oynamaktadır.

Sentetik olarak üretilen ve daha çok antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılan ticari adlı Trolox, rutin, butillenmiş hidroksi toluen (BHT), butillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi antioksidanlar da mevcuttur. Peroksi radikaliyle iki aşamada etkileşerek çok daha az reaktif ürünlere dönüştüren 2,6 di-tert-butil-4 metil fenol yani butillenmiş hidroksi toluen (BHT) önemli sentetik antioksidandır.



Süper antioksidan haplar, Japon eriği, kokusuz sarımsak, mavi-yeşil alg (yosun), havuç, portakal ve badem konsantreleri ilave edilmiş “Activin” üzüm çekirdeği ekstresinden oluşan bir bitkisel karışım olup ayrıca A, C, E vitaminleri, selenyum, çinko ve kalsiyum

mineralleri de içermektedir. Ayrıca ürünü oluşturan doğal bitki özleri, vitaminler ve mineraller antioksidan etkileri bilinen ve bu amaç için kullanılan özel maddelerdir. Son yıllarda üretilen bu tür haplar yapay antioksidanlara örnek teşkil etmektedir

Ferritin, laktoferrin, seruloplazmin, hemoglobin, α -globulin gibi plazma ve eritrosit proteinleri Fe, Cu gibi serbest metal iyonlarını bağlayabilme kabiliyetinden dolayı Fenton reaksiyonunu ve diğer radikal oluşturan reaksiyonların oluşumunu engellediği için birer antioksidan olarak rol oynarlar (Dündar ve Aslan, 2000).

1.3. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler

Doğal bileşiklere verilen önem her geçen gün artmaktadır. Bu bileşiklerin bir kısmı ise bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküller olup, sinyal (haberci) olarak ve mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak 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 substitüye olmuş halleridir.

1.3.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler altı üyeli aromatik halkaya direkt bağlı bir hidroksil grubu (-OH) içeren aromatik bileşiklerdir. Bu bileşikler zayıf asidiktirler: hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli olmalarından dolayı oluşan fenolat anyonunun ($C_6H_5O^-$) sudaki çözünürlüğü hayli yüksektir (URL-2, 2006). Fenolik bileşikler bitkilerin temel bileşenlerindedir ve bitkilerin ve onlardan türetilen ürünlerinin besinsel ve organoleptik özelliklerinde önemli rol oynarlar (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003; Fang vd., 2007). Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi olup 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.

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6000'den daha fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Bravo, 1998).

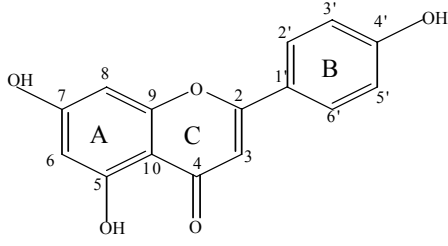
Polifenoller, bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir. (Wollgast ve Anklam, 2000). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki ayrı gruba bölünebilir.

Fenolik asitler yaygın olarak bitki taç kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptir. Başlıca fenolik asitler gallik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit gibi hidroksibenzoik asitler ve ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asit gibi hidroksi sinnamik asitleri içerir.

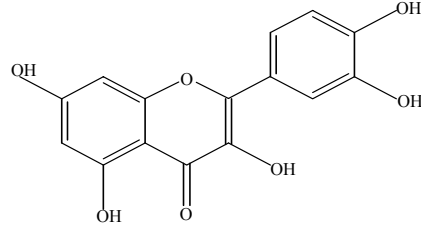
Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler renk, tat ve koku gibi organoleptik özelliklerden sorumlu oldukları için, analizlerini önemli derecede ilginç yapan bu tür ürünlerin kalitesiyle yakından ilgilidirler (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003).

Ayrıca son yıllarda pek çok araştırma çalışmaları polifenoller bakımından zengin besinlerin tüketimiyle onların antioksidan özellikleri sayesinde kardiovasküler hastalıklar, belli kanser tipleri ve diğer yaşlanmayla ilgili hastalıklardan korunmayı ilişkilendirmişlerdir (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003; Rise-Evans ve Packer, 1998; Chang ve Kinghorn, 2001). Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasiteleri onların molekül yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayısı ve flavonoidlerin kimyasal yapılarındaki diğer özellikler onların antioksidan ve serbest radikal temizleme aktiviteleri için önemlidir (Suschetet vd., 1998). Kuersetin dietlerde en bol bulunan flavonol olup serbest radikal temizleme aktivitesi açısından tüm doğru yapısal özelliklere sahip olduğu için potansiyel bir antioksidandır (Pietta, 2000, Erkoç v.d., 2003). Flavonoidler insan vücudu tarafından üretilemezler ve bundan dolayı da başlıca günlük diyetlerden alınmalıdırlar.

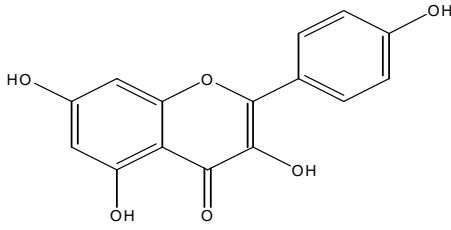
Flavonoidler genişçe düzlemsel moleküllerdir ve yapılarının çeşitliliği hidroksilasyon, metoksilasyon, prenilasyon veya glikozilasyon gibi süstitüsyon modellerinden kaynaklanır. Flavonoid aglikonlar C-4 de bir karbonil ve C-3 de bir hidroksil grubunun varlığı, C-2 ve C-3 arasında doymuş bir tekli bağ ve C-3 de hidroksil grubu ve C-4 de karbonil grubunun olmadığı 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 vd., 2004).



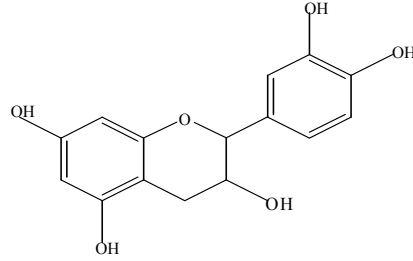
Apigenin
(Flavon)



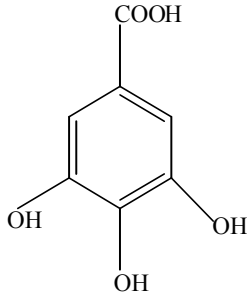
Kuersetin
(Flavonol)



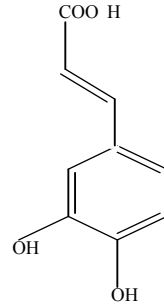
Kaempferol
(Flavonol)



Kateşin
(Flavanol)



Gallik Asit
(Hidroksibenzoik asit türevi)

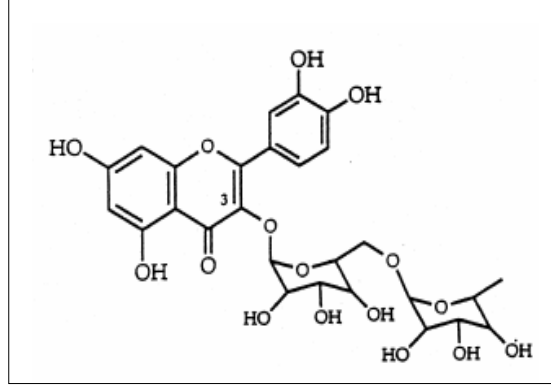


Kafeik Asit
(Sinnamik asit türevi)

Şekil 1. Diyetlerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin yapıları

Bazen aglikonları halinde mevcut olmalarına rağmen flavonoidler genellikle onların sudaki çözünürlüğünü artıran ve inaktif formda depolanmalarına müsaade eden glikozit formlarında bulunurlar (Cuyckens ve Claeys, 2004). *O*- ve *C*- olmak üzere iki glikozidik bağ tipi vardır. *C*- glikozilasyon bölgesi aglikonun *C*-6 veya *C*-8 pozisyonuyla sınırlıyken, *O*- glukozilasyon 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 şekerle bağlıdır. Flavonoidlerde genellikle

glükozillenen belli hidroksil grupları vardır. Bunlar flavonlar, flavanonlar ve izoflavonlarda 7-hidroksil grubu ve flavonoller ve flavanollerde 3- ve 7-hidroksil gruplarıdır. 5-hidroksil grubu C-4 de bitişik karbonil grubuyla hidrojen bağına katıldığı için C-4 de karbonil gruplu bileşikler için 5-*O*-glukozidler nadirdir (Prasain vd., 2004).



Şekil 2. Kuersetin-3-*O*- β -rutinozit (rutin)'in yapısı

UV (Ultraviyole) ya da MS (kütle spektroskopisi) dedeksiyonuyla birlikte RP-LC (ters faz-sıvı kromatografisi) bitki ekstraktlarının fenolik bileşimleri için seçilen bir metottur. Fenollerin ayrılması genellikle metanol (MeOH) veya asetonitril (CH₃CN, ACN) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren su hareketli fazlarıyla çalışan C18 kolonlarında gerçekleştirilir. Mobil 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 vd., 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 vd., 2004).

On-line UV spektrum bileşiklerin tanımlanmasını kolaylaştırırken, diyot serili dedektörler (DAD) seçicilik ve duyarlılığı optimize etmek için farklı dalga boylarının eş zamanlı olarak görüntülenmesi için kullanılırlar. RP-LC-DAD (ters faz-sıvı kromatografisi-diyot serili dedektör), pek çok fenolik bileşik için güçlü bir analiz yöntemi olacağı gösterilmiştir. Fakat yinede UV dedeksiyon belli uygulamalar için yeterince duyarlı ve spesifik değildir. MS'in HPLC ile kombinasyonu (LC-MS) muhteşem seçici ve

duyarlı teknikleri sayesinde bu dezavantajların üstesinden başarıyla gelmiştir (Chilla vd., 1996; Goldberg vd., 1996; Bovanová ve Brandšteterová, 2000; Malovaná vd., 2001). UV dedeksiyonu ile seri olarak MS'in kullanımı bitki ekstraktlarında polifenollerin analizi için çarpıcı bir alternatif sunar. RP-LC gücünün yüksek çözünürlükte ayırmayı sağlamasıyla birlikte MS tarafından analitlerin kesin tanımlanması şimdi mümkündür.

Fenoliklerin LC-MS karakterizasyonu için çeşitli iyonlaştırma metotları kullanılmaktadır. Son zamanlarda, ilave yapısal bilgi sağlamak için pek çok durumda çarpışmadan kaynaklanan ayırışma kullanımı pozitif veya negatif MS tipinde elektro spreyl iyonlaştırma (ESI) ile bağlı LC kullanılarak bu bileşikler irdelenmiştir (Wu vd., 2004).

Bu çalışmada, DAD ve ESI-iyon tuzak MS ile RP-LC'in kombinasyonu ile *P. bistorta* ssp. *carneum* ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

1.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

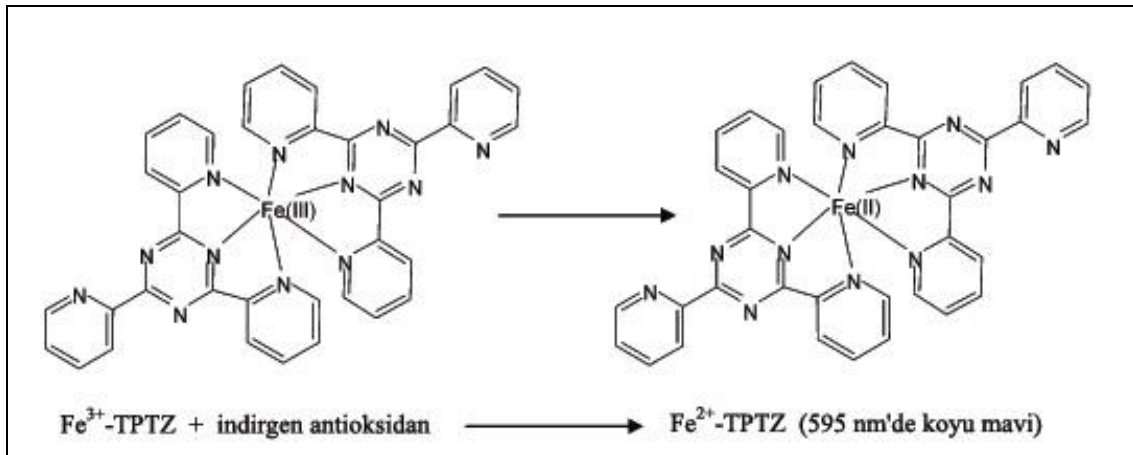
Antioksidanlar oksidatif stresle, prooksidanların gıdalarda, çevrede ve organizmada meydana getireceği hasarlarla mücadelede kullanılmaktadırlar. Maddelerin bu amaçla kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla birçok antioksidan tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında en yaygın kullanılanları burada özetlenecektir.

1.4.1. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi

Ohkawa vd., (1979) nin ortaya koyduğu metot bir miktar değiştirilerek uygulanmaktadır. Metot, karaciğer doku homojenatı, Fe⁺² ve C vitamini muamele edilerek oluşturulan Fenton reaksiyon karışımında oluşan bir lipid peroksit ürünü olan MDA'nın sıcak ve asidik ortamda tiyobarbiturik asit ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu renkli kompleks 532 nm'de maksimum absorban oluşturur. Tayinde antioksidan aktivite köre göre MDA oluşumunu %50 inhibe eden madde miktarları (IC₅₀) cinsinden verilir. %50 İnhibisyonu en az konsantrasyonda sağlayabilen madde miktarını veren madde antioksidan aktivite yönünden en etkili olanıdır. MDA oluşumunun engellenmesi antioksidan aktivitenin varlığını gösterir.

1.4.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Oyaizu (1986) tarafından ortaya konan metoda göre indirgeme kuvveti özütün dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ indirgenmesi ile meydana gelen renk değişimi 700 nm'de takip edilerek belirlenir. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlanır. Güncel olarak kullanılan FRAP metodunda 2,4,6-tripiridil-*s*-triazin (TPTZ)'in Fe(III) tuzu kullanılmaktadır. Bu yöntemle redoks potansiyeli 0.7 V'tan daha düşük olan bileşikler antioksidan olarak test edilebilmektedir. Polifenolik antioksidanlarda hidroksilasyon ve konjugasyonun miktarı bu yöntemde aktiviteyi etkilemektedir. FRAP yöntemi H transferi ile radikal temizleyen özellikle tiol ve proteinlerin antioksidan kapasitesini ölçmemektedir.



Şekil 3. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

1.4.3. Tiyosiyanat Metodu

Bu metod linolenik asit, Tween-20 ve fosfat tamponu ile oluşturulan emülsiyon ortamında bulunan doymamış bir yağ asidi olan linolenik asidin 40 °C'de 140 saat oksijen ile inkübasyonunda oluşan lipid peroksidin miktarının ölçümüne dayanmaktadır. Yüksek absorbans düşük antioksidan aktiviteyi, düşük absorbans ise yüksek antioksidan aktiviteyi gösterir. Ortamda bir antioksidan maddenin varlığında lipid peroksit ürünü oluşamaz ve konsantrasyonu dolayısıyla absorbansı düşük çıkar.

1.4.4. Floresans Sönme Zamanı Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Chang vd. (2001) tarafından kullanılan metot modifiye edilmiştir. Silika jelden hazırlanmış ve flöresans özelliğe sahip alüminyum-silikajel tabakalara nümune (özüt) emdirilip kurutulduktan sonra plaka linolenik asit emülsiyonuna daldırılır, tamamen kurutulur ve UV-lamba (254 nm) altında bekletilir. Bu sırada oksijenin de etkisi ile linolenik asit emülsiyonunda önce kararmalar ve sonra parlak lekeler oluşur. Oluşan bu parlak lekelerin kaybolma zamanı antioksidan varlığına bağlıdır ve antioksidan maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

1.4.5. Toplam Fenolik Madde Tayini

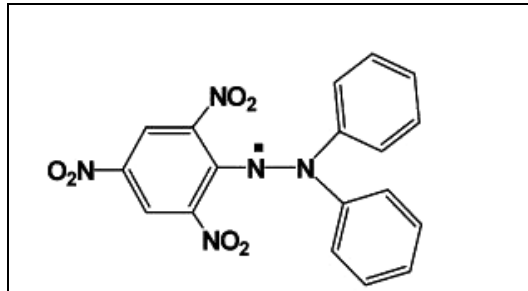
Metot, suda ve diğer organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-menekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorbanı oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1977). Bu metod aslında numunenin indirgeme kapasitesini ölçmesine rağmen adı bunu yansıtmamaktadır. Yani yöntem aslında bir antioksidan tayin yöntemidir.

1.4.6. Toplam Antioksidan Güç (TAR) Tayin Metodu

Bu tayin Erel (2004) tarafından gerçekleştirilen metot modifiye edilerek yapılmaktadır. Fe^{+2} -*o*-dianisidin çözeltisi ve H_2O_2 çözeltisi Fenton tipi bir reaksiyon vererek OH^\bullet radikalini oluşturmaktadır. Oluşan bu radikal düşük pH'larda renksiz *o*-dianisidin moleküllerini, sarı-kahverengi rengindeki dianisidil radikallerine oksitlemektedir. Dianisidil radikalleri üzerinden başlayan bu oksidasyon sonucu dianisidil radikalleri de kendi aralarında reaksiyona girerek büyük kompleksler oluşturmakta, diğer oksidasyonlara neden olmakta ve zincirleme oksidasyon reaksiyonları gerçekleşmekte ve oluşan renk giderek koyulaşmaktadır. Fakat ortama katılan ve antioksidan özellik gösteren bir madde bu oksidasyon reaksiyonlarını durdurmakta ve dolayısıyla rengin koyulaşmasını da engellemektedir.

1.4.7. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm’de maksimum absorbans oluşturmaktadır (Cuendet vd., 1997). Antioksidanlarla muamele, DPPH•’tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olacaktır. Farklı numune konsantrasyonu ile muamele edilen DPPH•’ın absorbansındaki değişim ölçülerek absorbanlara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilerek $y=ax+b$ denkleminde DPPH• konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı $\mu\text{g/mL}$ cinsinden belirlenmekte ve IC_{50} değeri olarak ifade edilmektedir. Bu metodun önemli bir dezavantajı büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir. Bu metoda antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir. Bu metod radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır.



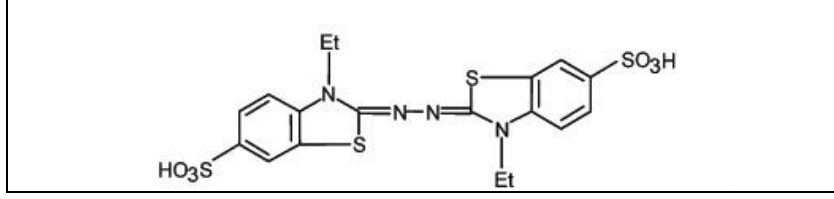
Şekil 4. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

1.4.8. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

Bu yöntemde floresan bir protein olan β -fikoeritrin (β -PE) kullanılmaktadır. β -PE’den kaynaklanan floresanstaki azalışın şiddeti onun peroksil radikalinden gördüğü hasarın miktarını göstermektedir. Numunedeki antioksidan floresanstaki bu düşüşü yavaşlatmakta ya da durdurmaktadır.

1.4.9. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi

Bu yöntem ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) molekülünün H_2O_2 ve metmyoglobinle mavi-yeşil renkli $ABTS^{\bullet+}$ radikaline dönüşmesi ve bu dönüşümün 734 nm'de fotometrik olarak gözlenmesine dayanmaktadır. Antioksidan mevcudiyetinde bu dönüşüm engellenmektedir.



Şekil 5. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) ($ABTS^{\bullet+}$) radikalinin formülü

1.5. Antimikrobiyal Maddeler

20. yüzyılın başlarına kadar insan organizmasına zarar vermeden mikroorganizmaları etkilemenin imkansız olduğu düşünülüyordu. M.Ö 2500 yıllarında bilinçsiz olarak antimikrobik tedavi yöntemleri uygulanmış ve bu devirde enfeksiyon hastalıkları tedavisinde bitki kökleri, şarap ve küf gibi maddeler kullanılmıştır.

1600'lü yıllarda Güney Amerika'da, insanlar cinchora bitkisinin kabuğunu yiyerek sıtımadan korunmuşlar, ipeka bitkisinin kök ekstresini kullanarak amipli dizanteri hastalığını tedavi etmişlerdir. Cinchora bitkisinin kabuğunda kinin, ipeka bitkisinin köklerinde ise emetin bulunduğu belirlenmiştir. 20. yüzyıldan itibaren patojen mikroorganizmalar hakkında bilgiler arttıkça enfeksiyon hastalıkları ile savaş da bilinçli olarak sürdürülmüştür.

1854-1915 yılları arasında Paul Ehrlich, bir arsenik bileşiği olan arsfenamin ile sifilizi, tripan kırmızısı boyası ile Afrika uyku hastalığını tedavi etmeyi başarmıştır. 1927 yıllarında Almanya'da kimya endüstrisi alanında çalışan Gerhard Domagk ve ekibi, çeşitli boyaların patojen bakterilere etkinliğini ve hayvanlardaki toksik etkisini araştırmışlardır. Bu araştırma sırasında, deri boyamada kullanılan prontosil kırmızısı adlı boyanın hayvanlara toksik olmadığını, stafilokok ve streptokoklara etkili olduğunu saptamışlardır

ve bu bulgunun 1935 yılında yayınlanmasından bir yıl sonra prontosil kırmızısının vücutta sülfanilamide dönüştüğü ve antibakteriyel aktiviteyi bu maddenin sağladığı anlaşılmıştır.

1929 yılında S. Alexander Fleming tarafından bulunan ve bu yıllarda toksik etkileri nedeniyle kullanım alanına giremeyen penisilin 1940 yılında kullanılır hale Ernest Chain ve Howard Florey tarafından getirilmiştir. Penisilin 2. Dünya Savaşı'nda yara enfeksiyonlu birçok askerin hayatını kurtarmıştır. Son yıllarda antibakteriyel etki alanı daha genişlemiş ve toksik etkisi az olan birçok antibiyotik ve kemoterapötik üretilmiştir.

1.5.1. Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri

Antimikrobiyal maddede olması gereken en önemli özellik seçici toksisitedir. Kemoterapide kullanılan antimikrobiyal madde düşük konsantrasyonlarda bile etkili olup çok az toksik olmalıdır. Böyle bir etkinin ortaya çıkabilmesi için antimikrobiyal maddenin hedef olarak memeli hücrelerinden çok mikroorganizmalar seçilmelidir. Bakteriler prokaryot, memeli hücreler ökaryottur. Prokaryot hücrede var olan, ancak ökaryot hücrede bulunmayan bir molekülü hedefleyen antimikrobiyal maddeler (örneğin; sefalosporinler, sülfonamidler) yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptir. Virüsler konak hücreye entegre olduklarından, konağa zarar vermeden virüsü etkilemek olanaksızdır. Virüslere etkili ilaçların seçici toksisitesinden hiç söz edilemez. Mantarlarda ökaryot hücre yapısındadır ve memeli hücrelerine benzerler. Bu nedenle antimikrobiyal maddeler için seçici toksisiteden söz edilemez.

Antimikrobiyal maddeler etkili olabildikleri mikroorganizma cins sayısının az yada çok oluşuna bağlı olarak, dar yada geniş spektrumlu şekilde tanımlanır. En dar spekturumlu maddeler enfeksiyona neden olan mikroorganizma üzerine etkili ve tedavide ideal antimikrobiyal maddeler olarak kabul edilir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler konağın doğal bağışıklığında önemli rol oynayan ve ekolojik dengeyi sağlayan normal mikroorganizma florasını bozar. Fakat birçok patojenin birlikte etken olduğu enfeksiyonlarda ya da mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının beklenemeyeceği acil durumlarda geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler (karbapenemler, kinolonlar...) kullanılır.

Bazı bakteri ve mantar türleri tarafından oluşturulan, mikrobisid veya mikrobiyostatik etki gösteren maddelere antibiyotik denir. Mikrobisid madde mikroorganizmaları öldürücü, mikrobiyostatik madde ise mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösterirler.

Antibiyotiklerle benzer özelliklere sahip olan, tümüyle sentetik (kimyasal yolla sentez edilen) olan maddelere de kemoterapötik denir.

1.5.2. Antibakteriyel Maddenin Sınıflandırılması

Antibakteriyel maddeler bakteriler üzerine beş farklı yoldan etki eder:

- 1-) Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu
 - Beta-laktam antibiyotikler, penisilinler, glikopeptid antibiyotikler
- 2-) Sitoplazma zarının fonksiyon ve yapısının bozulması
 - Polimksinler
- 3-) Protein sentezinin inhibisyonu
 - Amino glikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolid antibiyotikler
- 4-) Nükleik asit sentez ve fonksiyonlarının bozulması
 - Kinonlar, rifamisin, nitrofurantoin
- 5-) Kimyasal yapılardaki benzerlik yolu ile metabolizmanın bozulması
 - Sülfonamidler

1.5.3. Antibiyotiklere Duyarlılık Deneyleri

Günümüzde enfeksiyon hastalıkları etken mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılık deneyi sonuçlarına göre, enfeksiyon etkeninin duyarlı bulunduğu en uygun antimikrobiyal madde ile tedavi edilir. Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılığı temelde iki farklı yöntem ile belirlenebilir.

1. Dilüsyon Yöntemi
2. Difüzyon Yöntemi

Dilüsyon Yöntemi: Antibiyotiklerin sıvı veya katı (agarda dilüsyon) besiyerlerinde bir seri halinde seyreltilmesi ve her bir seyreltme ortamına, duyarlılığı belirlenecek bakterinin belirli sayıda hücre içeren süspansiyonundan eşit miktarda ilave edilmesidir. Deney serileri uygun sıcaklıkta (35-37 °C'de) ve bakterinin üremesi için uygun süre (16-20 saat) bekletildikten sonra sonuçlar ile bakterinin üremesini durduran en az antibiyotik miktarı (minimum inhibisyon konsantrasyonu, MIC) belirlenir.

Difüzyon Yöntemi: Yöntemin esası belirli konsantrasyondaki antibiyotiklerin katı besiyerine difüze olması yani yayılmasıdır. Antibiyotikler genellikle kağıt disklere belli konsantrasyonlarda emdirilir ve bunlar antibiyotik kaynağı olarak kullanılır. Bu yöntem disk-difüzyon yöntemi olarak adlandırılır. Dilüsyon yönteminden farkı antimikrobiyal maddelerin bir tek konsantrasyonunun etkinliği denir.

Disk-difüzyon yöntemine benzeyen, minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) belirlenmesini sağlayan E-testi (Dereceli antibiyotik şeridi yöntem) kantitatif yöntem olarak kullanılır.

1.6. Bitki Bileşenlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler

1.6.1. Modern Kromatografik Yöntemler

Kromatografi diğer yöntemler tarafından ayrılmaları çoğunlukla mümkün olmayan pek çok karmaşık karışımlardaki benzer bileşenlerinin ayrılmalarına izin veren çeşitli ve önemli metotlar grubudur. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülür. Ardından bu hareketli faz uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Bu iki faz öyle seçilir ki numunenin bileşenleri hareketli faz ve sabit faz arasında kendiliklerinden farklı derecelerde dağılırlar. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla sadece yavaşça hareket ederler. Öte yandan sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler ise hızlıca hareket ederler. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar (Skoog vd., 1998).

Kromatografi hareketli fazın özelliklerine bağlı olarak başlıca üç forma ayrılabilir:

- Gaz kromatografisi
- Sıvı kromatografisi
- Süperkritik akışkan kromatografisi

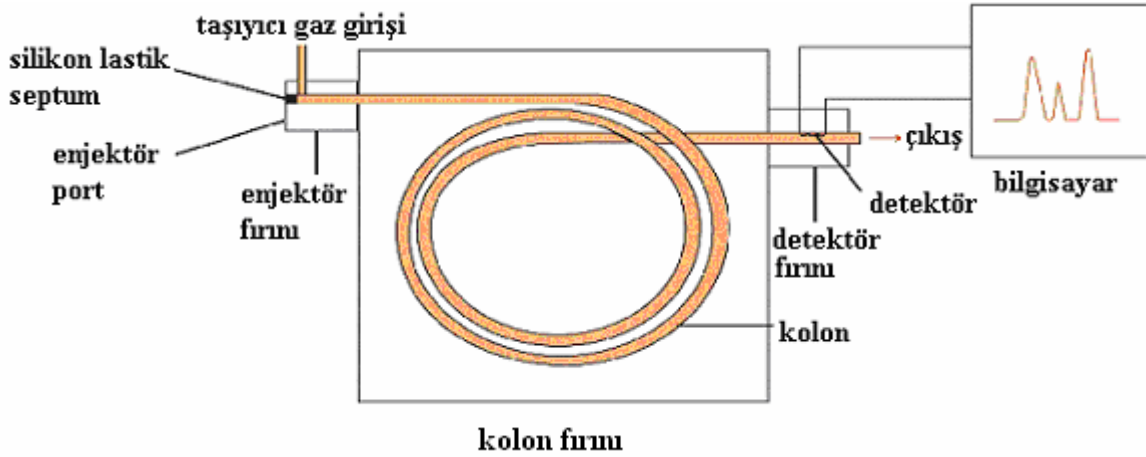
Kromatografik işlemler aşağıdakilere göre sınıflandırılabilirler:

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

Sıvı kromatografide tüm bu dört form uygulanabilir. Bileşenlerin uçuculuğunun gerekli oluşunun bir sonucu olarak gaz kromatografisinde yalnızca adsorpsiyon kromatografisi ve paylaşım kromatografisi uygulanabilir (Sandra, 2004).

1.6.1.1. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi uçucu organik bileşikleri ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Tipik bir modern gaz kromatografi sistemi bir gaz hareketli faz kaynağı, bir enjeksiyon portu, sabit faz içeren bir ayırma kolonu, bir dedektör ve bir veri kayıt sisteminden oluşmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. Genel bir gaz kromatografi sistemi

Kolon boyunca numuneyi ilerletmek için hareketli faz olarak genellikle hidrojen, helyum ya da azot gibi kimyaca inert gazlar taşıyıcı gaz olarak kullanılır. Gaz akış hızını sabit tutmak için akış metreler ve basınçölçerler kullanılır.

Kapiler gaz kromatografisi (CGC), günümüzde uygulanan en yaygın gaz kromatografi (GC) formudur. CGC'de küçük iç çaplı (milimetrenin onda birkaçı) kapiler sabit faz ile kaplıdır. Çoğu kapiler kolonlar dışı poliimidle kaplı eritilmiş silikadan yapılmıştır. Bu kolonlar esnektirler ve bu sayede çok uzun bir kolon küçük bir bobin halinde sarılabilir.

Organik bileşikler kolonda hareketli faz ve sabit faz arasında farklı dağılım davranışlarından dolayı ayrılırlar. GC kolonlarında en yaygın sabit fazlar polisiloksanlardır ki onlara fazın polaritesini değiştirmek için çeşitli substüent gruplar eklenir. En apolar

sabit faz polidimetilsiloksandır, ki fenil ve/veya siyanopropil grupları polimerin üzerine eklenerek daha polar yapılabilir. Çok polar analitler için polietilen glikol (örneğin Carbowax 20M) yaygın bir şekilde sabit faz olarak kullanılır (URL-3, 2006).

Kolon sıcaklığı hızlı bir şekilde artıp azalabilen bir fırının içinde tutulur. Sıcaklık arttıkça kaynama noktası düşük olan bileşikler yüksek olanlardan daha erken kolondan ayrılırlar. Bundan dolayı sıcaklık ve önce de ifade edilmiş olan sabit faz etkileşimleri gerçekte iki ayrı ayırma kuvvetleridir.

Enjeksiyon sistemi için iki önemli gereksinim vardır. Enjeksiyon kromatografik bant genişlemesine neden olmamalı ve analiz edilecek numune kolonun içine kalitatif ve kantitatif değişime uğramadan taşınmalıdır (Sandra, 2004). GC vasıtasıyla geniş çeşitlilikte bileşikler ve numuneler analiz edilebildiği için çeşitli enjektörler geliştirilmiştir. Enjektörler evrensel ve seçici olmak üzere ikiye bölünebilir. Evrensel enjektörler; a) direkt, b) split- splitless, c) kolonda soğuk ve e) sıcaklık programlı buharlaşma (PTV) enjektörleridir (Sandra, 2004). En yaygın enjeksiyon sistemi split-splitless enjeksiyondur ve mevcut çalışmada da bu enjeksiyon kullanıldığı için yalnızca bu enjeksiyon metoduna özetle değinilecektir. Kapiler gaz kromatografisinde kapiler kolonun düşük numune hacminden dolayı ve bant genişlemesinden kaçınmak için split enjeksiyon yaygın şekilde kullanılır. İki enjeksiyon valfi sayesinde buharlaşma bölümünde hem taşıyıcı gaz hem de taşıyıcı gaz ile numune buharlarını içeren gaz karışımının akışı düzenlenir. Buharlaşma bölümü 250–300 °C'e kadar ısıtılan bir cam veya kuartz tüp (6–12 cm uzunluğunda, 3–4 mm i.d.)'den oluşmaktadır. Split enjeksiyonun en önemli dezavantajı numunenin çoğu ayrılma ve kaydetmeden önce sistemden çıktığı için duyarlılığının sınırlı olmasıdır. Bu yüzden gerektiğinde duyarlılığı yüksek olan splitless enjeksiyon kullanılır. Bu durumda split valfi enjeksiyon esnasında kapatılır ve buharlaşma bölümünden kolona gönderilir (Sandra, 2004).

Dedektörün amacı kolonda ayrılmalarından sonra hareketli fazdaki analitlerin varlığını kaydetmektir. Dedektör bir bileşiğin varlığı tespit edildiğinde elektrik sinyali oluşturma kapasitesine sahiptir. Sinyal var olan analitin miktarıyla doğru orantılıdır. Dedektörün en önemli özellikleri duyarlılık, dinamik aralık ve seçiciliktir.

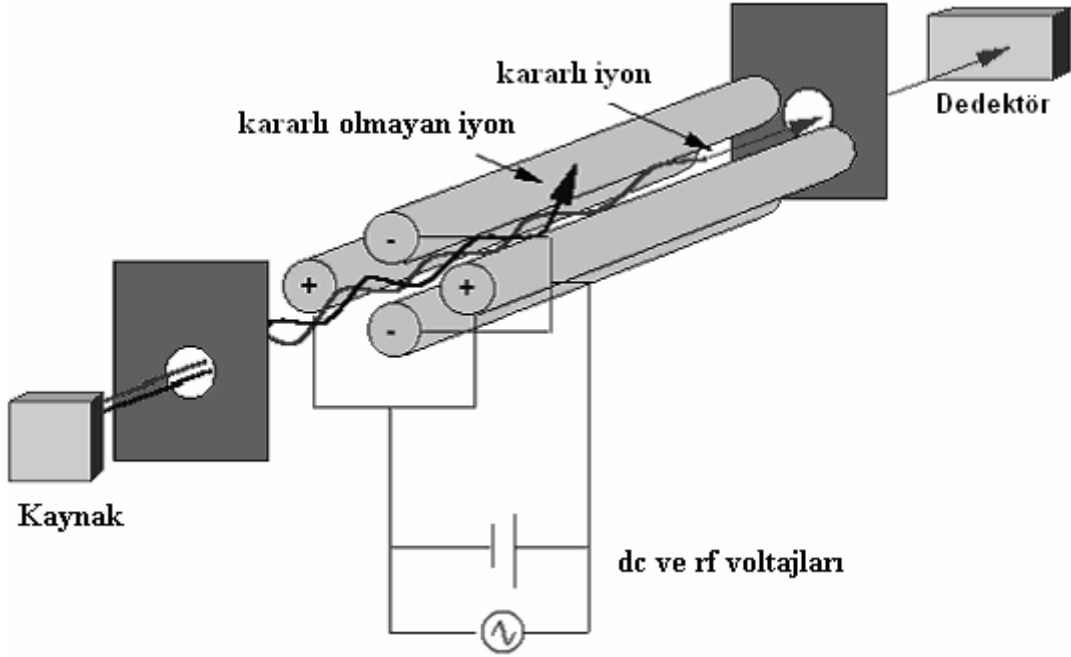
Kromatografide koşturma esnasında bilgisayar dedektör sinyalinden bir grafik üretir. Bu grafiğe kromatogram denir. Bir bileşik GC kolonundan dedektöre elue edildiğinde kromatogramda oluşan pik, üretilen sinyali temsil eder. Kromatogramda x-ekseni alıkonma zamanını, y-ekseni sinyalin şiddetini (bolluk) gösterir. GC'de kullanılan pek çok dedektör

tipleri içinde en önemlileri alev iyonlaşma dedektörü (FID), elektron yakalama dedektörü (ECD) ve kütle spektrometrik dedektördür (MS).

1.6.1.1.1. Kütle Spektrometrik Dedektör

Kütle spektrometresi yüklü moleküler iyon veya fragmentler olarak analitlerin kaydedilmelerine dayanan bir spektrometrik tekniktir. Kütle spektrometreleri temel olarak üç parçadan oluşurlar ki bunlar iyonlaşma kaynağı, kütle analizci ve dedektördür.

Kütle spektrometresinin iyonlaşma kaynağında analit molekülleri iyon haline dönüştürülür. Bu genellikle elektron impakt (EI) veya kimyasal iyonlaştırma (CI) sayesinde gerçekleştirilir. Bileşikler tek tek GC kolonundan elue edildikçe elektron iyonlaşma bölgesine girerler. Burada elektron akışıyla bombardımana uğratılırlar ki, bu onların fragmentleri halinde bölünmelerine sebep olur. Bu fragmentler orijinal molekülün büyük ya da küçük parçaları olabilir. Fragmentler gerçekte belli kütlelere sahip yüklü iyonlardır. Fragmentin yüküne bölünen kütlesi yük/kütle (m/z) oranı olarak adlandırılır. Çoğu fragmentler +1 yüküne sahip oldukları için m/z genellikle fragmentin molekül ağırlığını temsil eder (Baugh, 1993).



Şekil 7. Bir kuadrupol kütle analizörünün şematik diyagramı

GC'de en yaygın kullanılan analizörlerden biri de kuadropoldur. Kuadropol analizi (Şekil 7) bir kare tutucu içinde tutulan dört silindirik metal çubuktan ibarettir. Karşılıklı çubuklar elektriksel olarak birbirine bağlıdır; bir çift, değişebilir doğru akım kaynağının pozitif ucuna, diğer çift ise negatif ucuna bağlanır (Skoog vd., 1998). Çubuklar arasındaki bölgede elektrostatik alan üretilip salınarak bir doğru akım voltajı (DC) ve bir radyo frekansı (RF) çubuklara uygulanır (URL-4, 2006). İyonlar, çubuklar arasındaki kuadropolden aşağıya geç ederler. Doğru akım voltajına radyo frekansı bolluğunun oranına bağlı olarak iyonlar elektrik alanda bir salınım kazanırlar. Doğru kütle/yük oranına sahip olmayan iyonlar (ya çok küçük ya da çok büyük) kararsız bir salınıma maruz kalırlar ve çubuklara saldırırlar. Doğru kütle/yük oranına sahip olan iyonlar ise sabit bolluğun kararlı salınımına maruz kalırlar. Bu iyonlar çubuklara çarpmadan analizci boyunca geçer ve dedektöre ulaşırlar. Böylece özel iyonlar seçilebilir veya değişen voltajlarla taranabilirler (URL-4, 2006).

Kuadropoller m/z 'lerin bir oranı gözleninceye kadar diğer birinin baştan sona çevrimi için programlanabilir (Baugh, 1993). Bu saniyede pek çok defa gerçekleşir. Oranların her bir çevrimi bir tarama olarak ifade edilir. Günümüzde m/z 20 ve m/z 400 arasındaki iyonların taranması 1-100 s içinde gerçekleşebilir. Bilgisayar her bir tarama için bir grafik kaydeder. x-Ekseni m/z oranını ve y-ekseni tarama esnasında kaydedilen her bir fragment için şiddeti (bolluk) temsil eder. Bu şekilde oluşturulan grafiğe kütle spektrumu denir (Baugh, 1993). Sistemin kütle aralığı değişken RF/DC oranıyla ayarlanır. Operasyon kütle aralığı genellikle 1000'dir fakat bu tip kütle analizcileri ile 4000'in üstüne gayet makul olarak çıkarılabilir (URL-4, 2006).

Pek çok bileşiğin kütle spektrumu bilinir ve bunlar GC-MS enstrümanı kütüphanesinde mevcuttur. Kütüphane, örneğin spektrumu ile mevcut spektrumları karşılaştırarak sonuçları benzerliklerin istatistiksel bir ifadesi olarak bildirir.

1.6.1.2. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi

Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel v.b. numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin ayrılma ve belirlenmesi için uygulanan analitiksel bir tekniktir. Numunelerdeki bileşikler sıvı hareketli faz ve sabit faz arasında dağılım davranışlarındaki farklılıklardan dolayı kolon boyunca farklı hızlarda geçerler.

HPLC enstrümanları bir hareketli faz deposu, bir pompa, bir enjektör, bir ayırma kolonu (seçimli ön-kolon), bir kolon ısıtıcısı, bir dedektör ve bir integratör veya bilgisayarlı dijital sinyal alıcısı içerirler.

Tipik bir HPLC çalışması bir lineer değişim kullanarak karıştırılan iki çözücü ve kolon boyunca belli bir akış hızını içerir. Çözücülerin değişikliği ve ilaveler ayırmanın seçiciliğini optimize etmek için kullanılır. Çözücülerin bulunduğu hareketli faz depoları kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır (Skoog vd., 1998). Pompa yüksek basınçta sabit serbest-vuruş akışı sağlar ve ayırma esnasında çözücülerin çeşitli kompozisyonlarına programlanabilir. Akış hızı kolonun iç çapına bağlıdır; kolonda küçük iç çapı küçük akış hızı gerektirir. Analitik HPLC için tipik olarak 0,5–5 ml/dk akış hızı 400 bar'a kadar çalışan pompalar tarafından üretilebilir.

Genellikle modern LC için en faydalı ve yaygın kullanılan örnek verme düzeneği bir enjeksiyon valfinin kullanımına bağlıdır. Bu valfler akışın önemli derecede bozulmaksızın basınçlı kolonun içinde numunenin tekrarlanabilir girişi için kullanılır. Valfli enjeksiyon hızlı, tekrarlanabilir ve özellikle 400 bar'a kadar %0.2'den daha az hata ile numune hacminin (60 nl'den birkaç mililitrelere kadar) geniş bir aralıkta operatör bağımsız olarak dağıtımına müsaade eder (URL-5, 2006).

HPLC ile ayırmalar farklı operasyon tipleri kullanılarak başarılır. Özel bir uygulama için seçilen tip, ayrılacak analit(ler)in özelliklerine bağlı olacaktır (Lindsay, 1987). Çoğu HPLC ayırmalar dağılma tipinde çalışılır. Dağılma kromatografisi hareketli ve sabit fazlarının bağıl polarlığına bağlı olarak iki temel forma ayrılabilir (Skoog, 1998). Normal faz (NP) durumunda, sabit faz hareketli fazdan daha polardır ve en az polar analitler ilk elue edilirler. Analit tutunması hareketli fazın polaritesi arttıkça azalır. Ters faz kromatografide (RP), sabit faz hareketli fazdan daha az polardır. En polar analitler ilk elue edilirler ve analitin tutunması hareketli fazın hidrofobikliği arttıkça azalır. Yaklaşık olarak tüm HPLC analizlerinin %80'i RP tipinde çalışılır.

Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilirler. Silika jelde modifiye olan Oktil (C8) ve oktadesil (C18) en yaygın kullanılan fazlardır.

HPLC kolonlar (genelde 3-5 μm) dar bir boyut dağılımına sahip küçük partiküllerden oluşur ki bunlar apolar fonksiyonel grupların kullanımıyla modifiye edilirler. Mikro partiküllü materyaller yüksek basınçta kolon boyunca pompalanan hareketli fazı gerekli kılarlar. Kolonlar laboratuarda hazırlanabilir fakat çoğu analistler ticari olarak hazır

kolonlar satın alırlar. Analitik kolonun bozulmalardan korunması için bir koruyucu kolon, kolon ile enjeksiyon aletinin arasına kurulur.

Farklı boyutlardan kolonlar kullanılabilmesine rağmen, günümüzde 100–250 mm boyunda, 3–5 mm iç çaplı 5 µm sabit faz materyaliyle paketlenmiş kolonlar çoğu uygulamalar için mantıklı bir zamanda yeterli ayırımı sağlamaktadır.

Son otuz yılı aşkındır pek çok LC detektörler çeşitli ilkelere dayandırılarak geliştirilmiştir. Fakat yine de yalnızca onlardan yaklaşık on iki tanesi LC analizleri için etkin bir şekilde kullanılır ve bunların da yalnızca dördü yaygın kullanımdadır. LC analizinde kullanılan baskın detektörler UV detektör (sabit ve değişebilen dalga boyu), refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometredir (URL-6, 2006). Mevcut çalışmada yalnızca UV ve MS detektörler kullanıldığı için burada yalnızca onlar tartışılacak.

1.6.1.2.1. Ultraviyole Dedektör

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. Bu gerçekleştiğinde geçen ışın bir prizmanın içinden geçtiğinde bir spektrum üretilir ve bu absorpsiyon spektrumu olarak adlandırılır. Bir enerji absorpsiyonunun sonucu olarak atomlar ve moleküller düşük enerjili seviyeden (başlangıç ya da temel hal) daha yüksek bir seviyeye (uyarılmış hal) geçer. Absorbe edilen elektromagnetik enerji uyarılmış ve temel haller arasındaki enerji farkına eşittir (Jaffé ve Orchin, 1964).

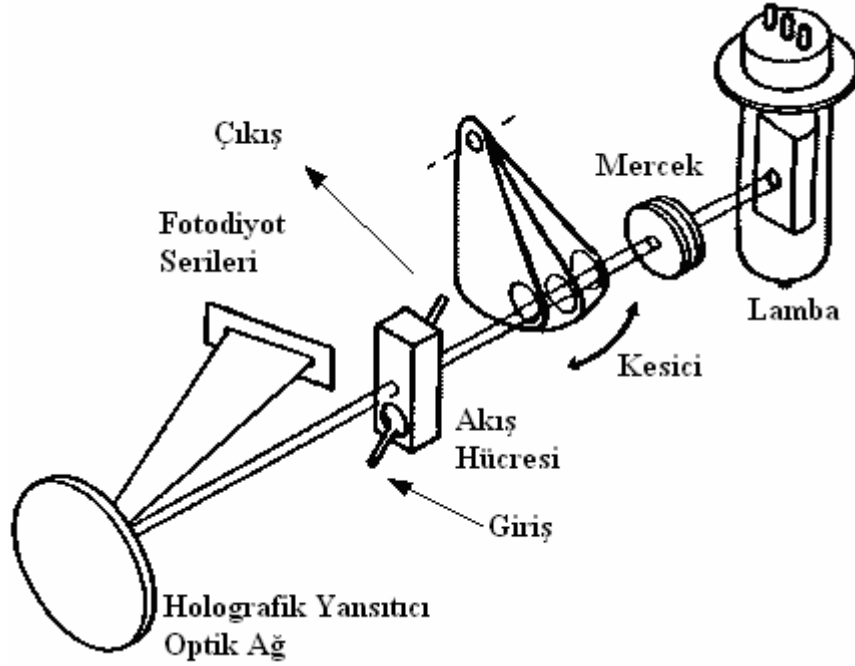
Tipik UV-VIS spektrofotometre, bir ışık kaynağı, bir monokromator, bir dedeksiyon hücresi ve bir dedektör içerir. Işık kaynağı genellikle spektrumun UV bölgesinde elektromagnetik enerjiyi yayan bir döteryum lambasıdır. İkinci bir ışık kaynağı olan tungsten lamba ise spektrumun VIS bölgesindeki dalga boyları için kullanılır.

Işık kaynağından gelen ışın demetini dalga boylarına göre ayıran cihazlara monokromatör denir. Monokromatörlerdeki slit aralıklarının bir sistemi numune hücresinde istenen dalga boylarına odaklanır. Numune hücresinden geçen ışın, onun bolluğunu (şiddetini) kaydeden dedektöre ulaşır. Modern enstrümanlarda fotodiyodlar kullanılmasına rağmen dedektör genellikle bir fotoçoğaltıcı tüptür. Tipik bir çift ışın demetli enstrümanda, ışık kaynağından çıkan ışın demeti numune ve referans ışını olarak

ikiye ayrılır. Referans kısmında, ışın şiddeti numune hücresi analit içermediğinde kaydedilen ışın şiddetine eşit olarak alınır (Jaffé ve Orchin, 1964).

Numune hücresi deneyde kullanılan elektromagnetik ışını geçiren bir materyalden yapılmalıdır. Görünür (visible) bölgedeki ölçümler için cam veya plastikten yapılmış hücreler kullanılır. Ancak ultraviyole bölgede kullanılamazlar, çünkü onlar ultraviyole ışığı absorbe ederler. Bunların yerine bu bölgede ışın absorplamadıkları için kuartzdan yapılmış hücreler kullanılır (Jaffé ve Orchin, 1964).

Tarif edilen enstrüman dizaynı tek bir dalga boyunda ölçüm için tam uygundur. Eğer komple bir spektrum istenirse bu tip enstrümanların bazı eksiklikleri vardır. Bir mekanik sistem monokromatörün dönmesini ve istenen tüm dalga boylarında tarama yapmasını gerektirir. Bu tip sistem yavaş çalışır ve bundan dolayı bir spektrumun kaydı için oldukça büyük zaman gereklidir(Jaffé ve Orchin, 1964).



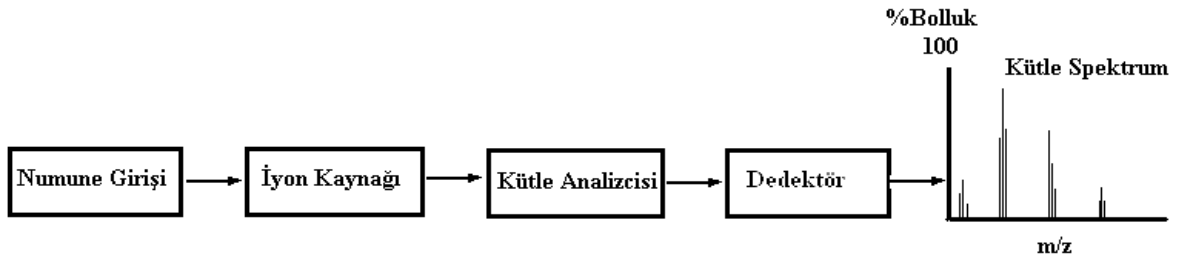
Şekil 8. Diyot serili dedektörün (DAD) şematik diyagramı

Geleneksel spektrofotometre üzerine modern bir gelişme diyot serili spektrofotometredir. Diyot serili dedektör, bir UV dalga boyunda sunulan dedeksiyona rağmen ayırıcı enstrümanlardan tamamen farklı bir şekilde çalışır. Bir foto diyot serili dedektör diyagramı Şekil 8’de gösterilmiştir. Lambadan gelen ışın farklı dalga boylarını ayıran ve onları direkt diyot serilerine gönderen holografik yansıtıcı optik ağa ulaşmadan

önce bir aralıktan ve numuneden geçer. Diyot serileri, bir silikon kristal üzerine köşeden köşeye yerleştirilen bir seri fotodiyot detektörleri içerir. Her bir diyot spektrumun dar bir bandını kaydetmek için tasarlanmıştır. Diyotlar öyle bağlanmışlardır ki tüm spektrum bir defada kaydedilir. Bu tip detektörler hareketli parçalara sahip değildir ve çok çabuk bir şekilde spektrumu kaydedebilirler. Ayrıca çıkışı bir bilgisayara geçirilebilir ve kullanışlı çıkış formatlarının bir çeşidi sağlar. Fotodiyotların sayısı sınırlı olduğundan hız ve güven çözünürlükte küçük bir kayıpla elde edilir. Yine de pek çok uygulamalar için bu tip enstrümanların avantajları çözünürlük kaybına ağır basmaktadır (Jaffé ve Orchin, 1964).

1.6.1.2.2. Kütle Spektrometrik Dedektör

Yüksek-performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometri (HPLC-MS) oldukça çok yönlü bir enstrümantal tekniktir. HPLC-MS'in GC-MS'e nispeten başlıca avantajı çok daha geniş bir yelpazede bileşiklerin analizini gerçekleştirebilme kapasitesine sahip olmasıdır. Yüksek polarite gösteren veya yüksek molekül ağırlıklı termal olarak kararsız bileşikler hatta proteinler bile rutin şekilde HPLC-MS kullanılarak tamamen analiz edilebilirler. Temel enstrüman örnek girişi (bir sıvı kromatografisi), iyonlaşma bölümü, kütle analizi ve dedektör ihtiva eder (Şekil 9).

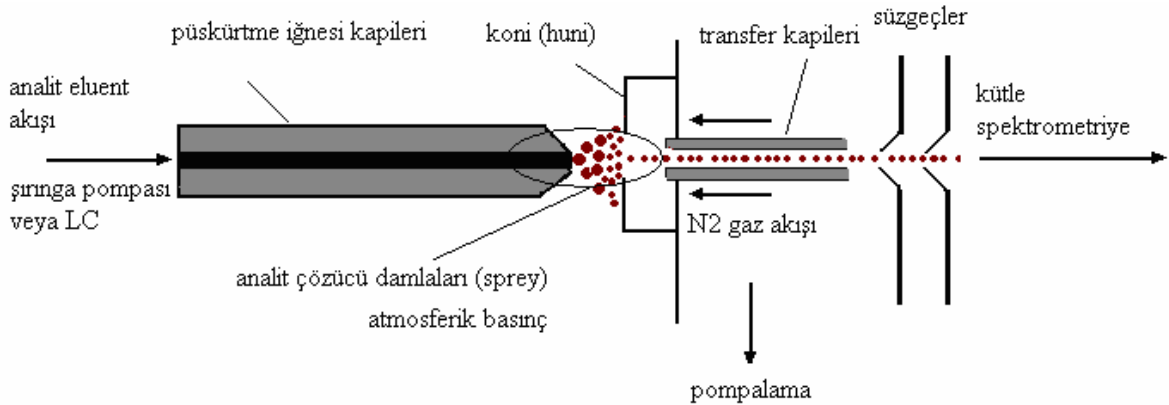


Şekil 9. Bir HPLC-MS enstrümanının yapısı

LC kolonunda elue edilen bileşikler bir iyonlaştırıcı aracılığıyla kütle spektrometreye gönderilir. HPLC-MS için kullanılan en yaygın iki iyonlaştırıcı elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma (APCI)'dir. ESI ve APCI'in her ikisi de iyonlaşmanın atmosferik basınçta gerçekleştiği yumuşak iyon kaynaklarıdır. Kütle spektrumu fragmentasyon teknikleri kullanılmadığı sürece esas olarak molekül ağırlığı bilgisini sağlar. Mümkün olan fragmentasyon teknikleri iyonlaşma kaynağında

çarpışmadan kaynaklanan ayrışma (CID), bir ardışık tipli enstrümanın çarpışma hücresinde CID veya iyon yakalama bölümündeki fragmentasyondur.

LC-ESI-MS’de analit 20–500 $\mu\text{l dk}^{-1}$ tipik akış hızında kaynağa gönderilir. Kolondan çıkan eluat tipik olarak 2,5 kV’dan 4 kV’luk alanda zıt elektroda karşı yüksek bir potansiyel farkına sahip elektrosprey iğneden geçer. Isıtılan buharlaştırma gazı (genellikle azot) iğnenin polaritesi kadar bir yüzey yükü ile iğnenin yüklü damlaların iyi bir püskürtme oluşturması için kullanılır. Damlalar iğnenin zıt elektrot üzerinde kaynak numune hunisine doğru püskürtülür. Damlalar iğne tepesi ve huni arasındaki alanda çapraz geçerek çözücü buharlaşır. Bu damlaların yüzey gerilimi yüke dayanamayacak kadar küçülmelerine sebep olur ki bu noktada Coulomb patlaması gerçekleşir ve damlalar parçalanır. Bu süreç küçük damlalar üretir ki sonunda yüklü analit molekülleri gaz haline gelinceye kadar tekrarlanır. Bu yüklü analit molekülleri tek ya da çok yüklü olabilirler (URL-8, 2006). Elektrosprey süreci Şekil 10’da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 10. Bir elektrosprey iyon kaynağının şematik diyagramı

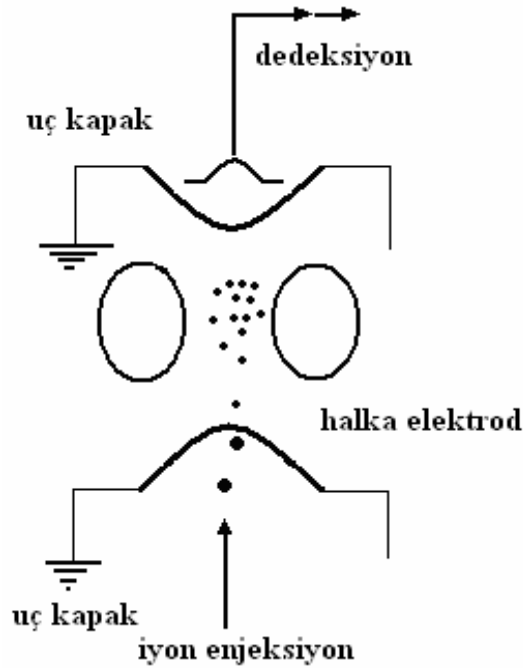
LC-MS’de en yaygın kullanılan kütle analizörleri kuadrupol (tekli ya da çoklu), iyon tuzaklı ve uçuş-zamanlı (TOF) kütle analizörleridir. GC-MS enstrümanlarında ilk kullanılan, iyon tuzaklı kütle analizörleridir, ve API kaynağı ile kombinasyonu LC-MS analizlerine uygundur.

Tuzağın prensibi, iyonların bir halka ve iki uç kapak elektrottan oluşan bir alette depolanmasıdır (Şekil 11). İyonlar halka elektrot üzerine bir RF voltajı uygulanarak tuzakta kararlı hale getirilirler. Maksimum etkinlik (çözünürlük ve duyarlılık) için iyonlar ideale en yakın alan olan tuzağın merkezine yakın odaklanmalıdırlar. Bu çarpışmalı olarak

enjekte edilen iyonları kararlı hale getirinceye kadar salınımlarını düşürerek serinleten gevşetici bir gaz (%99.998 helyum) girişiyle başarılı (URL-4, 2006).

Uç kapak elektrotlarda RF voltajının yükselmesiyle ya da uygulanan destek voltajıyla ya da bu ikisinin kombinasyonuyla:

- İyonlar kararsızlaşır ve farklı m/z oranlarındaki iyonlar tuzaktan detektöre ulaşır.
- Verilen m/z değerinde bir iyon tuzakta tutulur ve sonra spesifik olarak gözlemek için çıkarılır.
- Tuzakta tek bir iyon tutulur, titreşimlerle fragment olur ve fragmentler gözlenir. Bu durumda MS/MS deneyleri çalışır.
- Son işlem iyonların gelişmiş fragmentleri için birkaç kez tekrarlanır. Bu bir MSⁿ olarak ifade edilir (URL-4, 2006).



Şekil 11. Bir iyon tuzak detektörün şematik diyagramı

İyon tuzak analizöründe ulaşılabilen çözünürlük, tarama aralığı ve hızına bağlıdır. İkinci bir fraksiyonda birkaç bin daltonun üzerinde tarama olduğunda tipik çözünürlük bir kuadrupol çözünürlüğüne benzer. Fakat yinede azalan kütle aralığı boyunca daha düşük hızda taramayla çözünürlüğü artırmak mümkündür (URL-4, 2006).

SIM (single ion monitorization) tipte parametreler (RF ve DC voltajları) yalnızca spesifik bir kütle yada seçilen spesifik kütleleri gözlemek için kurulur. Bu tip, her bir kütleli yakalamak ve belirlemek için daha fazla zaman harcandığı için, fragmentlerin spesifik iyonlarıyla ilgilenen kullanıcılar için en yüksek duyarlılık sağlar. Aksine, tarama tipinde çalışırken gerekli kütle aralığı boyunca kütle spektrumu elde etmek için DC ve RF'nin şiddeti rampa yapar (sabit bir fragment RF/DC oranında tutarak). Duyarlılık taranan kütle aralığı, tarama hızı ve çözünürlüğün bir fonksiyonudur. Bu durumda duyarlılık azalarak her bir analit için daha fazla bilgi elde edilir (URL-4, 2006).

1.7. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Bitkisinin Özellikleri

Polygonum Polygonaceae ailesinde bir cinistir. Yaygın adları knotweed, knotgrass, bistort ve Türkçe olarak kurt pençesi olarak da bilinmektedir. Bu cins özellikle kuzey iklim sıcaklığında yetişir (URL-2, 2006). Bistort soğuğa karşı çok dirençlidir (-25 °C'den aşağı sıcaklıklar). Bu cinsin yaprakları henüz filizlenmeye başladığında baharın başında toplanır ve kurutulur. Bistort iç ve dış kanamalar, dizanteri, kolera v.b. için dahili ve harici olarak sıkça kullanılır. Ayrıca sistis, irritabl barsak sendromu, peptik ülser ve ülseratif koliti içeren yaygın şikayetlerin tedavisinde de dahili olarak alınır. Harici olarak küçük yanmalar ve yaralanmalar için iyi bir temizleyicidir ve faranjit, stomatit, anal fissure v.b. için tedavi edici olarak kullanılır. Ağız yıkama veya gargara yapılarak dişeti hastalığı, ağız ülseri ve boğaz ağrılarına karşı tedavi edici olarak kullanılır. Yaprakları kanama durdurucudur ve yaraların tedavisinde popülerdir (URL-8, 2006).

Bu çalışma için *P. bistorta* ssp. *carneum* Rize-İkizdere Anzer yaylasından 2004-Haziran ayında toplandı. Anadolu'nun kuzey-doğusunda yer alan Anzer bölgesi özellikle bu bölgeden elde edilen Anzer balıyla Türkiye'de çok meşhurdur. Anzer balının diğer ballardan daha fazla sağlık faydaları olduğuna inanılır ve bal üreticileri hepatit B gibi pek çok hastalığa karşı tedavi edici olduğunu ifade ederler. Anzer balının sağlık açısından faydalarının onun 60 endemik tür içeren 500 farklı çiçeğe sahip floral orijiniyle alakalı olduğu düşünülmektedir (URL-1, 2006).

Anzer balının kompozisyonu kısmen bal arıları tarafından ziyaret edilen bitkilerden türevlenmiştir. *P. bistorta* ssp. *carneum* Anzer balının karakterini belirlediği düşünülen endemik bitkilerden biridir.

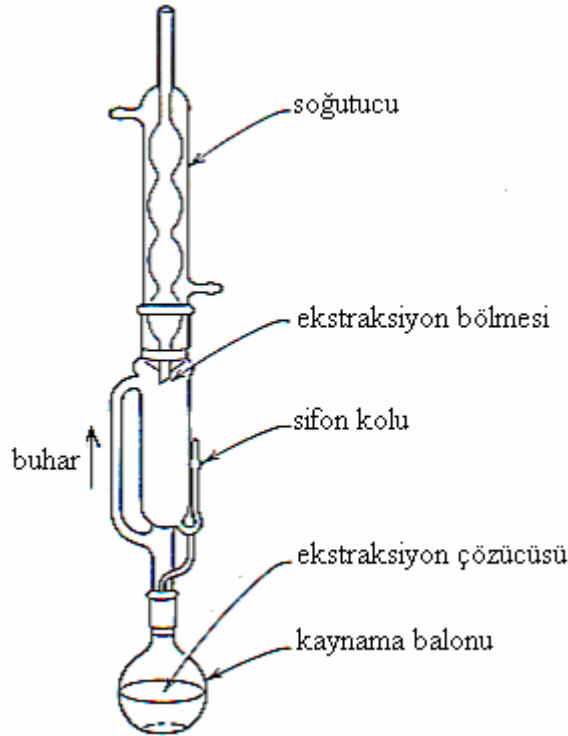
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkinin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması

P. bistorta ssp. *carneum* Rize'nin İkizdere ilçesinde yer alan Anzer yaylasından Haziran 2004'te toplandı. Bitkinin yaprak, çiçek ve sap kısımları açık havada kurutulduktan sonra bir öğütücü ile toz haline getirdi.

2.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraktör 1879'da Franz von Soxhlet tarafından icat edilmiştir. Orijinalde katı materyallerden sıvıların ekstraksiyonu için tasarlandı fakat katı numunelerden bileşiklerin ekstraksiyonlarının zor olduğu zamanlarda da kullanılabilir (URL-2, 2006).



Şekil 12. Soxhlet aparatı

Bir soxhlet ekstraksiyon sistemi bir karıştırıcı magnetik çubuk ile kaynama balonu, bir soxhlet aparatı, bir geri soğutucu ve bir ısıtıcıdan ibarettir (Şekil 12). Katı numune içeren

kartuş soxhlet aparatının bölmesine yerleştirilir. Kaynama balonundaki çözücü karıştırılarak ısıtılır. Çözücü buharları soğutucuya doğru çıkarlar ki orada soğutulmuş numunenin üzerine damlarlar. Numune materyali içeren soxhlet aparatının bölmesi yoğunlaştırılan çözücü ile yavaşça dolar ardından sifon hareketiyle balona geri boşalır. Bu sirkülasyon numune bileşiklerinin ayrıntılı ekstraksiyonu için pek çok kez tekrarlanmasına müsaade eder.

9.50 gr çiçek, 9.99 gr yaprak ve 10.33 gr sap kısımlarının tozları kloroform ve metanol ile ard arda soxhlet aparatında ekstrakte edildi. Her iki durumda da soxhlet aparatındaki çözücü renksiz oluncaya kadar yaklaşık 6 saat ekstraksiyon sürdürüldü.

Her bir kloroform ve metanol ekstraktının konsantrasyonu, belli bir hacimde alınan ekstraktın evaporasyonu sonucu elde edilen kuru toz halinin ağırlığı ile hesaplandı. Bulunan konsantrasyonlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kloroform ve metanol ekstraktlarının belirlenen konsantrasyonları

	Konsantrasyon (mg/mL)					
	Çiçek	Toplam Ekstrakt hacmi (mL)	Yaprak	Toplam Ekstrakt hacmi (mL)	Sap	Toplam Ekstrakt hacmi (mL)
Kloroform	1.06	180	2.6	75.5	0.58	225
Metanol	4.655	345	4.544	365	6.239	258

Metanolik ekstraktlar LC analizlerinden önce, kloroform ekstraktları GC analizlerinden önce Whatman 0.2 µm PVDF filtrelerle süzüldü.

2.1.2. Sulu Ekstraktların Hazırlanması

Sulu ekstraktlar destilasyon balonlarında bitkinin çiçek (10.737 g), yaprak (10.3 g) ve sap (10.52 g) kısımlarının suyla geri soğutucu altında yaklaşık 6 saat kaynatılarak ve ardından santrifüj edilerek elde edilmişlerdir.

Tablo 3. Su ekstraktlarının belirlenen konsantrasyonları

	Ekstrakt		
	Çiçek	Yaprak	Sap
Konsantrasyon (mg /mL)	14.124	3.58	3.091

2.1.3. Döner Vakum Evaporatörü ile Çözücü Uçurulması

Bir döner vakum evaporatörüyle tek basamaklı destilasyonlar hızlıca yapılabilir. Bu yöntemin esası, dönen buharlaştırıcı bir balon kullanılarak çözücülerin buharlaştırılması ve yoğunlaştırılmasıdır. Destilasyonlar vakum altında yapılabilir. Bu performansı artırır ve ürünleri korumaya yardım eder. Vakum kaynama sıcaklığını düşürür ve böylece destilasyonun performansını artırır. Bu amaç için ikinci bir yoğunlaştırıcı ile vakum kontrolörü vardır. Oval şekilli su banyosu ile büyük ve küçük uçurma balonlarının ısıtılması sağlanır (Şekil 13).

Ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal kapasitelerinin belirlenmesinde konsantrasyonları belirli numuneler kullanılmıştır. Bu amaçla numunelerden alınan belli hacimdeki kısımların döner buharlaştırma düzeneği kullanılarak çözücülerini tamamen uçurularak konsantrasyonları tayin edildi. Ekstraktların kalanı tayinlerde kullanılmak üzere +4°C’ de saklandı.



Şekil 13. Döner buharlaştırma düzeneği

2.2. Kimyasal Analiz

2.2.1. Kloroform Ekstraktlarının GC-MS ile Analizleri

2.2.1.1. Giriş

Bu bölümde *P. bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak, çiçek ve saplarından elde edilen kloroform ekstraktlarındaki uçucu bileşikler analiz edildi. Tüm ekstraktlar tanımlanan koşullar altında split-splitless enjektörlü GC-MS kullanılarak analiz edildi.

2.2.1.2. Materyal ve Metotlar

HPLC enjektör filtreler (13 mm, 0.2 µm, PVDF) Whatman (Clifton, NJ, USA)'dan satın alındı. Ekstraksiyonlar için taze destile edilmiş kloroform kullanıldı.

2.2.1.3. GC-MS Koşulları

Numunelerin kloroform ekstraktları için 5973 sabit Kütle Seçici Detektör (Agilent Tech., Little Falls, DE, USA) ile donanımlı A 6890N gaz kromatografi (Agilent Tech., Little Falls, DE, USA) kullanıldı. Taşıyıcı gaz helyum 1.8 ml/dk hızıyla kullanıldı. Sabit basınç 100.0 kPa olarak çalışıldı. Splitless tip, 300 °C enjeksiyon sıcaklığı ile kullanıldı. Kapiler GC analizi bir 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm HP-5MS kolon (Agilent Tech., Little Falls, DE, USA) ile çalışıldı. Fırın sıcaklığı 40 °C (0 dk) dan 10 °C/dk artış ile 300°C'ye ulaşacak şekilde programlandı. Toplam koşma zamanı 36 dk ve dedektörün gecikme süresi 4 dk'ya ayarlandı. Enjekte edilen numunenin hacmi 1 µl idi. Bileşiklerin tanımlanması onların kütle spektrumları Wiley kütüphanesinde depolananlarla karşılaştırılarak yapıldı.

2.2.2. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin Analizi

2.2.2.1. Materyaller

Analitik derecede fenolik standartlar gallik asit, protokatekuik asit (3,4-dihidroksi benzoik asit), kateşin, gentisik asit (*p*-OH benzoik asit), vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, rutin, ferulik asit ve kuersetin, Sigma-Aldrich (Bornem,

Belçika)'den veya Riedel-de Haën (Bornem, Belçika)'den satın alındı. LC-DAD deneylerinde ve numune hazırlamada kullanılan HPLC derecede asetonitril, metanol ve asetik asit Sigma-Aldrich'den satın alındı. LC-MS deneylerinde kullanılan LC-MS derecede asetonitril ve su Biosolve LTD'den satın alındı. Hidroliz deneyleri için kullanılan HCl, UCB (Leuven, Belçika)'den satın alındı. HPLC şırınga filtreleri (13 mm, 0.2 µm, PVDF) Whatman (Clifton, NJ, USA)'dan satın alındı.

2.2.2.2. Hidroliz

Öncelikle azot gazı altında her bir ekstrakt için yeterli duyarlılık sağlayacak seviyede ön konsantrasyon işleminden sonra 1 mL numuneye 9 mL 2.94 M HCl eklendikten sonra her bir çözelti 1 saat azot gazı altında 100 °C'de reflaks edildi. Soğutulan çözeltiler bir Whatman 0.2 µm PVDF filtresiyle süzüldü ve LC-MS ile analiz edildi.

2.2.2.3. Standartlar ve Kalibrasyon

Rutin ve kuersetin dışında tüm stok çözeltiler %40'lık metanolde 50 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Rutin %50'lik, kuersetin ise %100'lük metanolde 50 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlandılar.

12 standardın 0.5, 2, 10, 40, 80 ppm'lik kalibrasyon örnekleri stok çözeltilerin % 40'lık metanolde seyreltilmesiyle hazırlandı. Her bir standardın konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi. Çeşitli standartların kalibrasyonu için sıralanan dalga boyları kullanıldı: gallik asit, protokatekuik asit, kateşin, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit, siringik asit ve epikateşin için 280 nm, kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit için 315 nm, ve rutin ve kuersetin için 370 nm.

2.2.2.4. LC-UV Koşulları

RP-LC-DAD analizleri Agilent (Waldbronn, Almanya)'den bir diyot serili dedektör ile donanımlı 1050 LC'de yapıldı. Enstrüman Chemstation programı ile (Agilent) kontrol edildi. Tüm analizler için bir Luna C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül; Phenomenex, Torrance, CA, USA) kullanıldı. Hareketli faz (A) %2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) 50/50 asetonitril/su içindeki %0.5 asetik asitin çözeltilerinden

oluşmaktaydı. Elüsyonda takip eden gradient kullanıldı: Başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-7 dk %5 B; 7-8 dk %5-15 B; 8-32 dk %15-35 B; 32-52 dk %35-45 B; 52-55 dk %45-100 B; 55-70 dk %100 B. Enjeksiyon hacmi 25 µL ve kolon sıcaklığı, Julabo (Seelbach/Almanya)'dan satın alınmış olan bir su banyosunda 30 °C'ye ayarlandı. Akış hızı 1 ml.dk⁻¹ idi ve dedektör 280, 315 ve 370 nm'lerde çalıştırıldı. UV spektrum 200-500 nm aralığında kaydedildi.

2.2.2.5. LC-UV İçin Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi

EPA metoduna göre dedeksiyon limiti hesaplandı (US EPA, 1984). Tüm 12 standardın 2 ppm'lik karışımı LC-DAD ile analiz edildi. Her bir analitin sinyalinin gürültüye oranına (S/N) dayanan değer Chemstation'dan belirlendi, 6 seviyesinde bir S/N sağlamak için gerekli konsantrasyon hesaplandı. Sonuç olarak, 0.4 ppm'de gallik asit, protokatekuik asit, kateşin, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve kuersetin ve 1 ppm'de *p*-OH benzoik asit, epikateşin ve rutin içeren kalibrasyon çözeltisi hazırlandı ve 7 kez analiz edildi. Ardından her bir bileşik için dedeksiyon limiti (LOD) pik alanı ve alıkonma zamanının yüzde bağıl standart sapması (%RSD) olarak hesaplandı.

2.2.2.6. LC-MS Koşulları

HPLC-MS analizleri için, bir LCQ iyon tuzak enstrüman (Thermo Electron, Brüksel, Belçika), bir pompa (Kontron Enstrümanlar) ve gaz giderici (Uniflows, Tokyo, Japon) ile donanımlı bir UV dedektöre (Kontron Uvicon 735LC, Kontron Instruments, Watford, UK) bağlandı. Bir Luna C18 kolon (250 mm × 2.00 mm i.d., 5 µm partikül) kullanıldı. Çarpışma gazı olarak Ultra yüksek saflıkta helyum (He) kullanıldı ve buharlaştırıcı gaz olarak yüksek saflıkta azot (N₂) kullanıldı. Kütle spektrometrenin optimizasyonu için, 50/50 A ve B hareketli faz çözeltisi içinde 10 ppm kateşin kullanıldı. Optimize edilen negatif elektrosprey iyonlaştırma (ESI) takip eden koşullar kullanılarak elde edildi: İyon sprej voltaj, 4.2 kV; kılıf gaz (N₂), 45 arbitrary birimi; yardımcı gaz (N₂), 15 birim; kapiler sıcaklık, 225 °C; kapiler voltaj, -47 V. Ful tarama MS analizleri için, m/z 100-900 aralığında spektrum kaydedildi. Çarpışmadan kaynaklanan dissosiyasyon (CID) enerjisi %50'ye ayarlandı.

2.2.3. Antioksidan Aktivite

2.2.3.1. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup denemelerimizde satın alınan bu radikalın 100 µM'lık metanolik çözeltisi kloroform ve metanol ekstraktlarında kullanıldı. Denemelerde Cuendet vd. (1997) metodu kullanıldı. Elde edilen ekstraktlar değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Eşit hacimde (750 µL) DPPH• çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda DPPH•'ın maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Kör olarak DPPH• çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC₅₀ değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı.

2.2.3.2. IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

IC₅₀ radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. IC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 6 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı IC₅₀ değerini vermektedir. IC₅₀ değeri mg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

2.2.4. Antimikrobiyal Aktivite

Numunelerin antibakterial ve antifungal kapasitelerini belirlemek amacıyla iki yöntem uygulanmıştır. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemede kullanılırken, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) tayin yöntemi ise metanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek üzere kullanılmıştır.

2.2.4.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

Bütün test mikroorganizmaları Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden temin edildi. Test edilen yedi bakteri ve iki maya-benzeri mantar: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 702 Roma, *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida tropicalis* ATCC 13803. Testte kloroform ekstraktlarında çözücü olarak kloroform kullanılarak hazırlanan 500 µg/mL konsantrasyondaki test çözeltileri kullanıldı.

Bu testte her bir mikroorganizma Mueller Hilton (MH) (Difco, Detroit, MI) broth'da süspanse hale getirilip yaklaşık mL'de 10^6 koloni oluşturan birime kadar seyreltilmiştir. Hazırlanan süspanسیونlar MH agar ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, MI) üzerine serilmiş ve kurutulmuştur. Maya benzeri mantarlar olan *C. albicans* ve *C. tropicalis* için SDA kullanılmıştır. Agar üzerinde steril bir mantar delici ile 5 mm çapında kuyucuklar delinmiş ve bu kuyucuklara 100 µL numune aktarılmıştır. 35 °C'de 18 saat inkübasyonu takiben antimikrobiyal aktivite test organizmalara karşı meydana gelen inhibisyon alanları ölçülerek belirlenmiştir. Cefazidime (Fortum) (10µg) standart antibakteriyel olarak ve Triflucan (5µg) standart antifungal referans olarak kullanılmıştır. Testler çift paralel çalışılmış ve sonuçlar inhibisyon alanının çapı cinsinden ifade edilmiştir: (-): < 5.5 mm; (+): 5.5-10 mm; (++) : 11-15 mm; (+++) : >16 mm.

2.2.4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Yöntemi

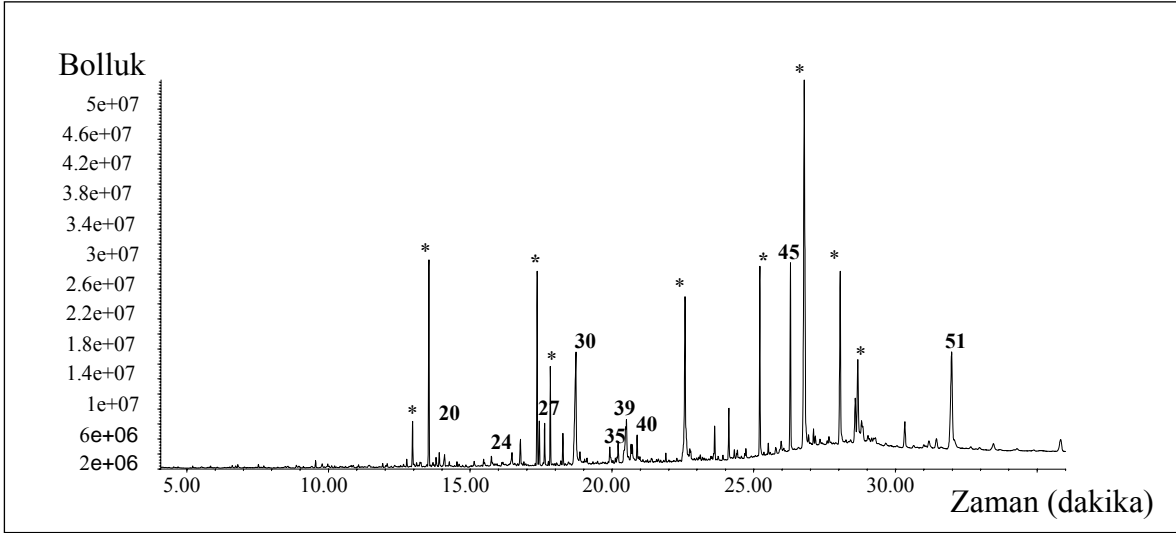
Bütün test mikroorganizmaları Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden temin edildi. Test edilen yedi bakteri ve iki maya-benzeri mantar: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 702 Roma, *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida tropicalis* ATCC 13803. Testte kullanılan ekstraktların 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltilerini hazırlanmak için dimetil sülfoksitte (DMSO) çözüldü. Seyreltmeler de aynı çözücü ile yapıldı.

Antimikrobiyal aktivite seyreltmeler yapılarak inhibisyonu sağlayan minimum numune konsantrasyonunu (MIC, µg/mL) belirleyerek değerlendirildi. Antibakteriyel test Mueller-

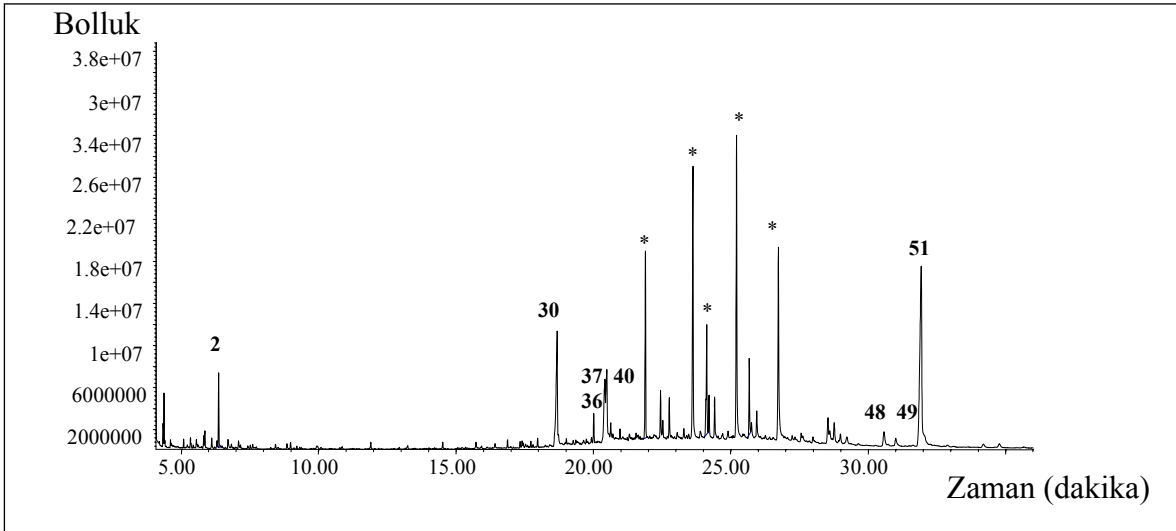
Hinton broth'da (MH) (Difco, Detroit, MI) pH 7.3'te, antifungal test tamponlanmış Yeast Nitrogen Base'de (Difco, Detroit, MI) pH 7.0'de gerçekleştirildi. MIC değeri büyümenin olmadığı en düşük numune konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Testler çift paralel çalışılmıştır. Ampicillin standart antibakteriyel, fluconazole standart antifungal referans olarak kullanılmıştır. Çalışmada dimetil sülfoksit (DMSO) özücü kontrolü olarak test edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

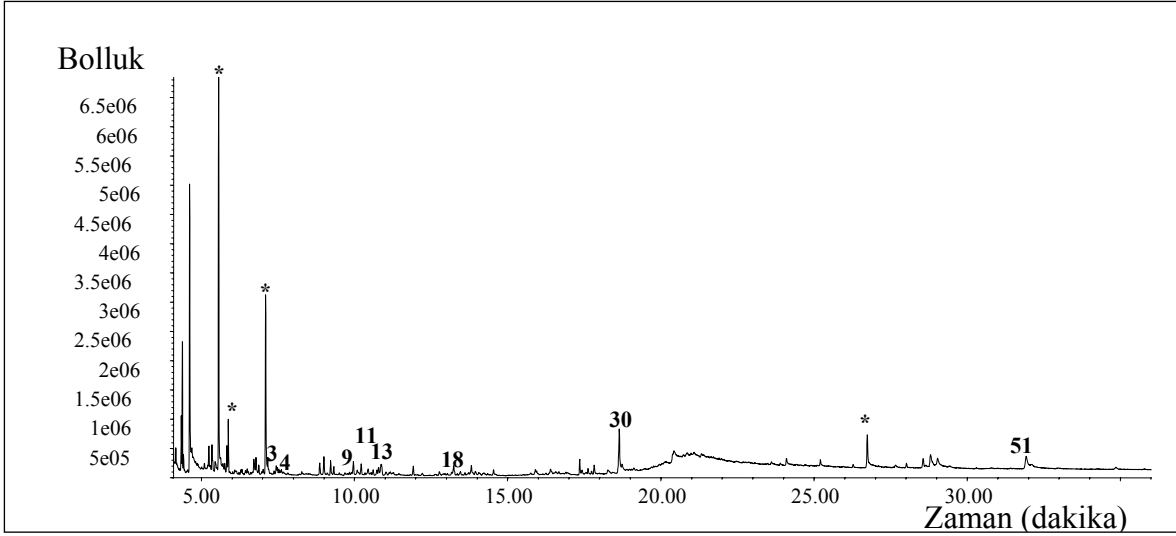
3.1. Kloroform Ekstraktları İçin Elde Edilen Kromatogramlar



Şekil 14. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un (numune 110YK) yaprak ekstraktlarının GC-MS kromatogramları. *: hidrokarbonlar



Şekil 15. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un (numune 110CK) çiçek ekstraktlarının GC-MS kromatogramları. *: hidrokarbonlar



Şekil 16. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un (numune 110SK) sap ekstraktlarının GC-MS kromatogramları. *: hidrokarbonlar

Tanımlanan Bileşikler

CGC-MS analizinde 28 farklı bileşik gözlemlendi. 5. dk'dan önceki elusyon için dedektör okuması yapılmadı. Bazı hidrokarbonlar 5. ve 34. dk arasında küçük miktarlarda gözlemlendi. Oldukça çeşitli ketonlar, karboksilik asitler, alkoller, esterler, organik asitler ve aldehitler gözlemlendi.

Tablo 4. Tüm ekstraktlarda GC-MS tarafından tanımlanan bileşikler

No	RT	Bileşik	110YK	110CK	110SK
1	6,4	D-limonen	—	X	—
2	7,2	2-Kloro-6-metil-fenol	—	—	X
3	7,4	2-Kloro-4-metil-fenol	—	—	X
4	7,5	Nonanal	—	X	—
5	9,96	(E)-2-Dekenal	—	—	X
6	10,1	4-Kloro-3-metil-fenol	—	X	X
7	10,4	(E,E)-2.4-Dekadienal	—	—	X
8	10,8	2,4-Dekadienal	—	X	X
9	12,9	2,6-Bis(1,1-dimetiletıl)-2,5-siklohegzadien-1,4-dion	—	X	—
10	13,5	2,4-Bis(1,1-dimetiletıl)-fenol	—	—	X
11	13,9	5,6,7,7a-Tetrahidro-4,4,7a-trimetıl-2(4H)-benzofuranon	X	—	—
12	14,1	Dodekanoik asit	—	X	—
13	16,5	Tetradekanoik asit	X	X	—

Tablo 4'ün devamı

No	RT	Bileşik	110YK	110CK	110SK
14	17,1	Oktadekanal	—	X	—
15	17,40	6,10,14-Trimetil-2-Pentadekanon	X	X	—
16	17,5	Pentadekanoik asit	—	X	—
17	18,3	14-Metil-pentadekanoik asit metil ester	—	X	—
18	18,9	n-Hegzadekanoik asit	X	X	X
19	20,2	Fitol	X	—	—
20	20,3	(Z,Z)-9,12-Oktadekadienoik asit	—	X	—
21	20,4	(Z,Z,Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit	—	X	—
22	20,5	(E)-9-Oktadekanoik asit	X	—	—
23	20,7	Oktadekanoik asit	X	X	—
24	26,3	Oktadekanal	X	—	—
25	30,6	Kampesterol	—	X	—
26	31	Stigmasterol	—	X	—
27	31,9	22,23-Dihidro-stigmasterol	X	X	X
28	34,2	Stigmast-4-en-3-on	—	X	—

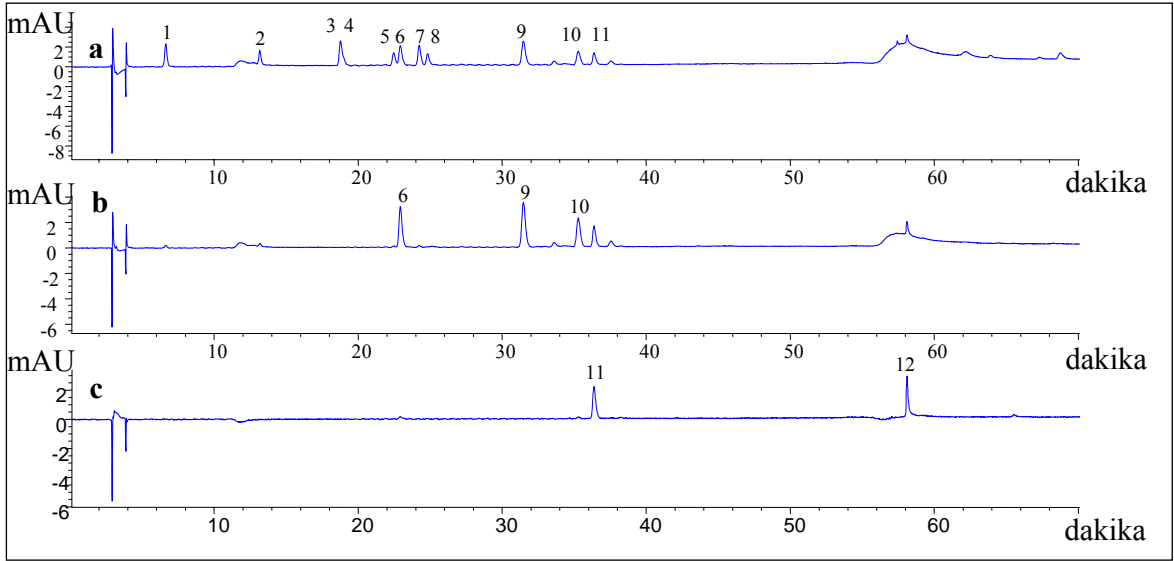
x: Bileşen GC-MS ile gözlemlendi; _: bileşen GC-MS ile gözlenmedi; 110YK, 110CK ve 110SK sırasıyla *P. bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak, çiçek ve sap ekstraktlarıdır.

Kloroform ekstraktlarında bulunan bazı bileşikler terapötik aktiviteleriyle tanınırlar. Stigmasteroller bir tip fitosteroldür ve kalp hastalıklarının riskini azaltır. Limonen bir terpen olarak sınıflandırılan hidrokarbondur. Terpenler ve terpenoidler pek çok çiçek ve bitki türlerinin esansiyel yağlarının birincil yapı taşlarıdır. Esansiyel yağlar gıdalar için doğal tatlandırıcı katkı maddesi, parfümeride güzel koku olarak, aroma terapide ve geleneksel ve alternatif tıpta yaygın olarak kullanılır. Terpen alkol olan fitol yeşil bitkilerde klorofile bağlı olarak bulunur ve bitkinin yalnızca yaprak kısmının kloroform ekstraktlarında tespit edilmiştir.

3.2. Fenolik Bileşikler

3.2.1. LC-UV Metot Geliştirme

Optimize edilen LC-DAD metodu kullanılarak 12 standart fenolik bileşiğin analizine bir örnek Şekil 17'de görülmektedir. Metot, 60 dakika içinde tüm analitlerin uygun bir şekilde ayrılmasını sağladı.



Şekil 17. LC-DAD tarafından 280 nm (a), 315 nm (b) ve 370 nm (c)'de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 ve 12 pikleri 0.4 ppm ve 4, 8 ve 11 pikleri 1 ppm konsantrasyonda elde edildiler). Koşullar: Kolon: Luna C18 kolon (250 mm × 2.00 mm i.d., 5 µm partiküller), hareketli faz: (A) suda %2 asetik asit, (B) 50/50 asetonitril/su içinde %0.5 asetik asit. Gradient detaylarına deneysel bölümde değinilmiştir. Enjeksiyon hacmi: 25 µL, sıcaklık: 30 °C.

Tablo 5. Geliştirilen LC-DAD metodunun parametreleri

No	Bileşik	%RSD (RT)	%RSD (Alan)	R ²	LOD*
1	Gallik asit	0,0581	1,1888	1	0,0293
2	Protokatekuik asit	0,0389	2,5897	1	0,0424
3	Kateşin	0,029	0,5956	0,9999	0,0574
4	<i>p</i> -OH Benzoik asit	—	—	1	—
5	Vanilik asit	0,0327	5,3385	0,9999	0,1186
6	Kafeik asit	0,0102	0,8313	0,9999	0,0515
7	Siringik asit	0,0132	1,8715	0,9999	0,0838
8	Epikateşin	0,03	4,0733	0,9999	0,0596
9	<i>p</i> -Kumarik asit	0,0128	1,4433	1	0,0791
10	Ferulik asit	0,0135	1,2998	1	0,0924
11	Rutin	0,0132	2,0085	1	0,1722
12	Kuersetin	0,007	6,4394	0,9999	0,6579

* dedeksiyon limiti (ppm)

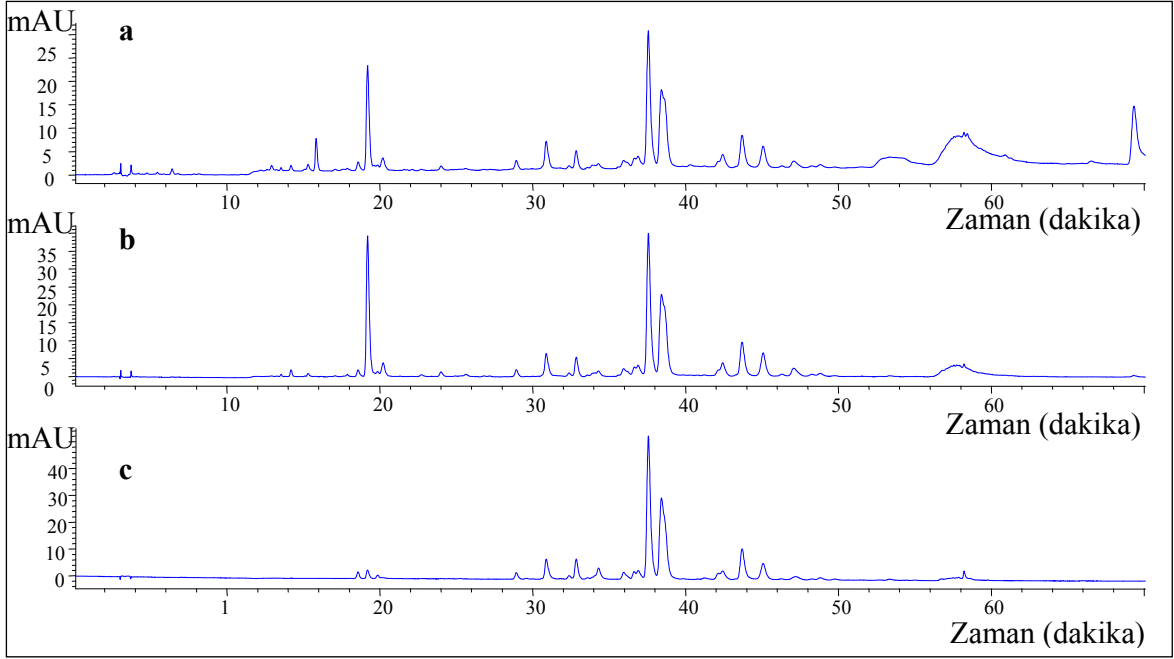
—: Mevcut koşullarda Kateşin piki ile çakışma yaptığı için *p*-OH benzoik asit için %RSD (RT), %RSD (Alan) ve LOD değerleri hesaplanamamıştır.

Başlangıçta geliştirilen LC-DAD metodu hassasiyet ve güçlülük açısından değerlendirildi. Alıkonma zamanı ve pik alanlarının çözünürlüğü LOD için standartlarla hazırlanan çözeltinin 7 kez enjeksiyonu ile belirlendi. Sonuçlar hesaplanan dedeksiyon limiti (LOD) ile birlikte Tablo 2’de mevcuttur. Düşük konsantrasyonlarda pik alanının çözünürlüğü kabul edilebilir değerlerde bulunurken, alıkonma zamanlarının mükemmel çözünürlüğü elde edildi. Ayrıca tüm 12 standart için lineer cevaplar ($R^2 > 0.999$) elde edildi (Tablo 5). Tüm standartlar için LOD değerleri 0.2 ppm’in altındadır ki bu değer bitki ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin dedeksiyonu için yeterlidir.

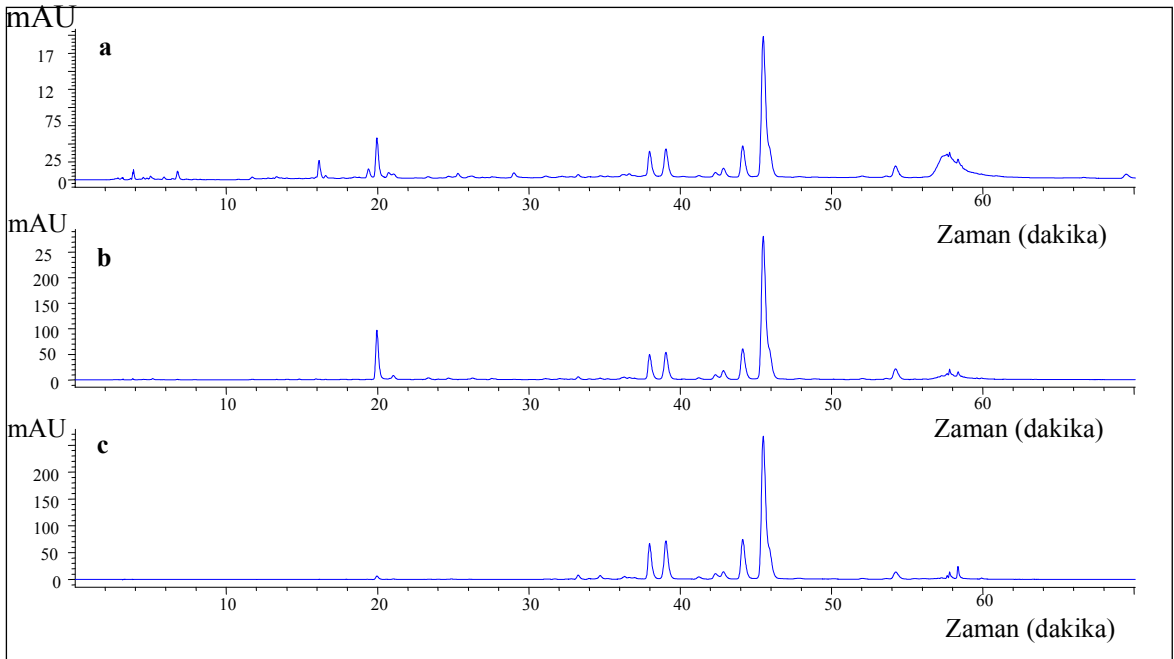
3.2.2. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Metanolik Ekstraktlarının LC-UV Analizleri

Fenolik standartlar kullanılarak LC-DAD metodunun optimizasyonunun ardından *P. bistorta* ssp. *carneum*’un metanolik ekstraktları analiz edildi. Yaprak, çiçek ve sapların analiz örnekleri Şekil 18-20’de sırasıyla verilmiştir. Bu ekstraktların her birinden önemli derecede farklı profiller elde edildi. 370 nm’yi fenolik bileşiklerden yalnızca flavonol türevleri absorbe ettiği için bu dalga boyunda elde edilen kromatogramlar ekstraktların her birinde fenolik bileşiklerin çoğunluğunun flavonol türevleri olduğunu gösteren kanıtlardır. Ayrıca flavonol aglikonlarının gradientin sonunda elue edildiği bilindiği için (bkz. kuersetin Şekil 17’de) esas piklerin flavonol glikozitlere karşılık gelmeleri mümkündür. Bu bileşikler içerdikleri şeker gruplarından dolayı daha yüksek bir polariteye sahiptirler ki böylece gradientte daha erken elue edilirler (bkz. rutin veya kuersetin-rutinozit, ~36 dk’da elue edilir, Şekil 17).

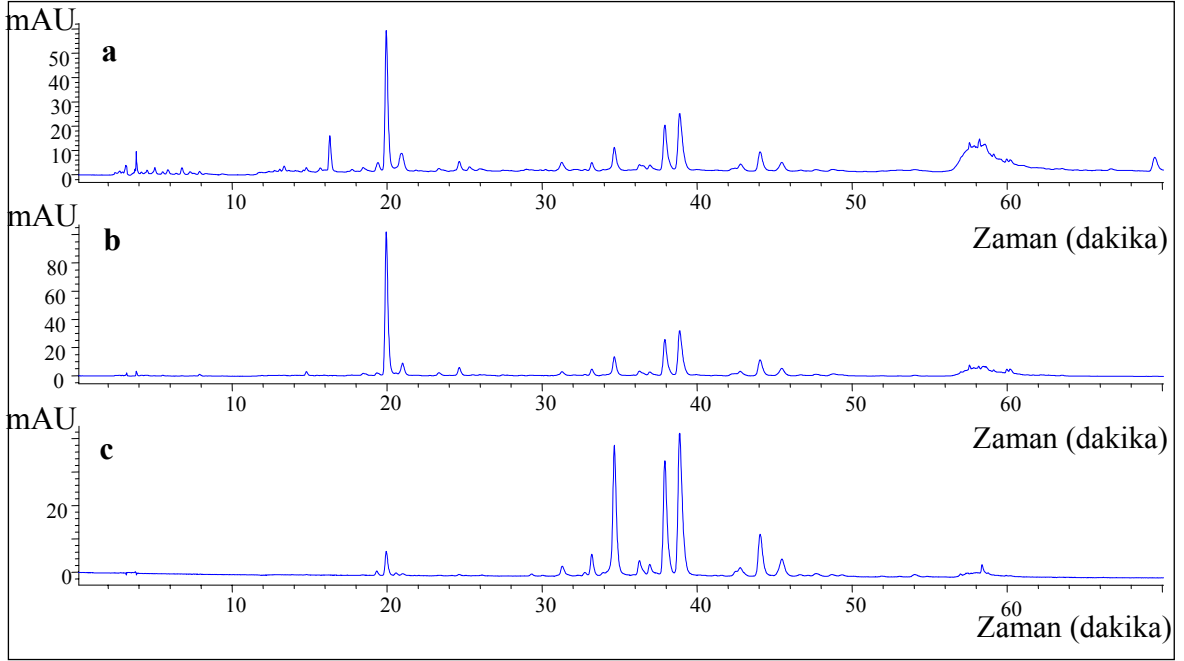
Bu hipotezi doğrulamak için, deneysel kısımda verildiği gibi ekstraktların asit hidrolizi gerçekleştirildi. Hidroliz flavonol aglikon ve bağlı glikozit arasındaki asite karşı kararlı olmayan C-O bağının kırılmasına sebep olur. Bu da flavonol-glikozitlerin kaybolmasına ve aynı zamanda da örneklerdeki flavonol aglikonların miktarlarının artmasına sebep olmalıdır.



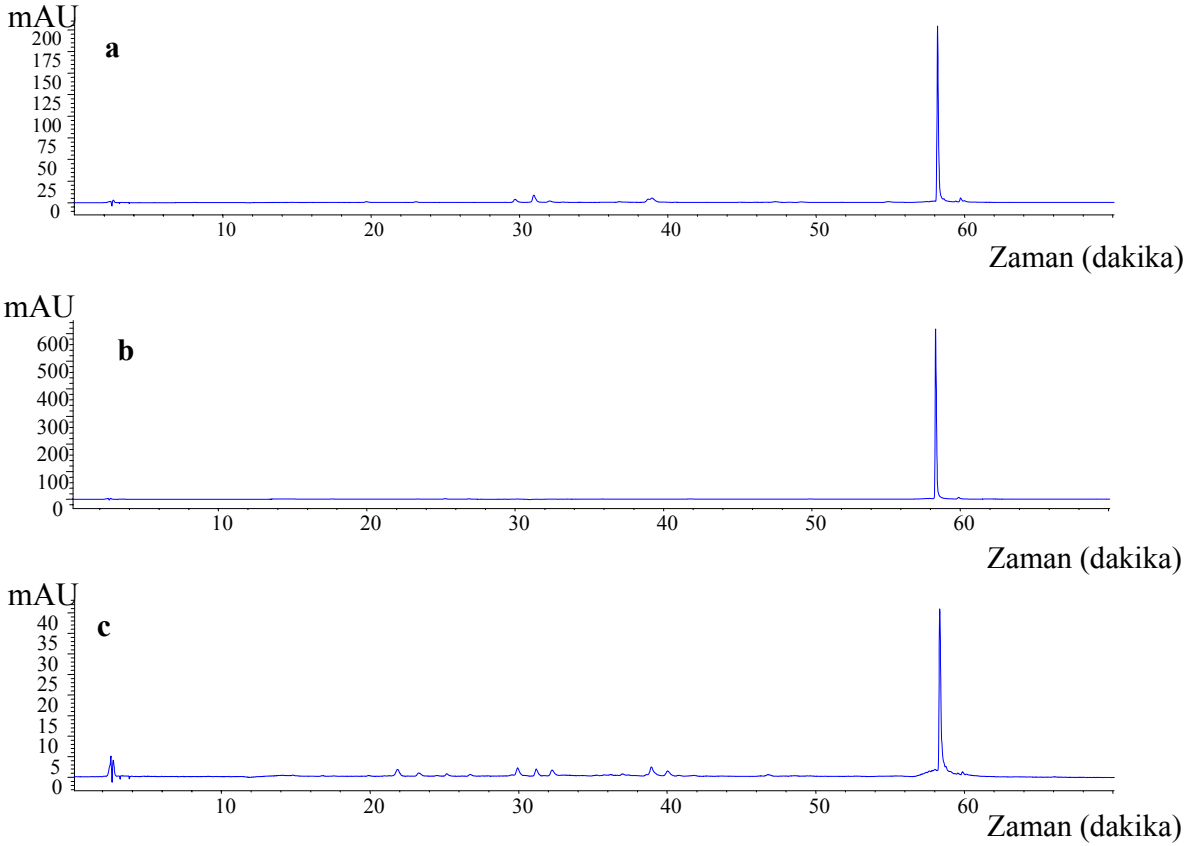
Şekil 18. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un metanolik yaprak ekstraktlarının a) 280 nm, (b) 315 nm ve (c) 370 nm'deki kromatogramları. Koşullar Şekil 17 ile aynıdır



Şekil 19. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un metanolik çiçek ekstraktlarının (a)280 nm, (b) 315 nm ve (c) 370 nm'deki kromatogramları. Koşullar Şekil 17 ile aynıdır



Şekil 20. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un metanolik sap ekstraktlarının (a) 280 nm, b) 315 nm ve (c) 370 nm'deki kromatogramları. Koşullar Şekil 17 ile aynıdır

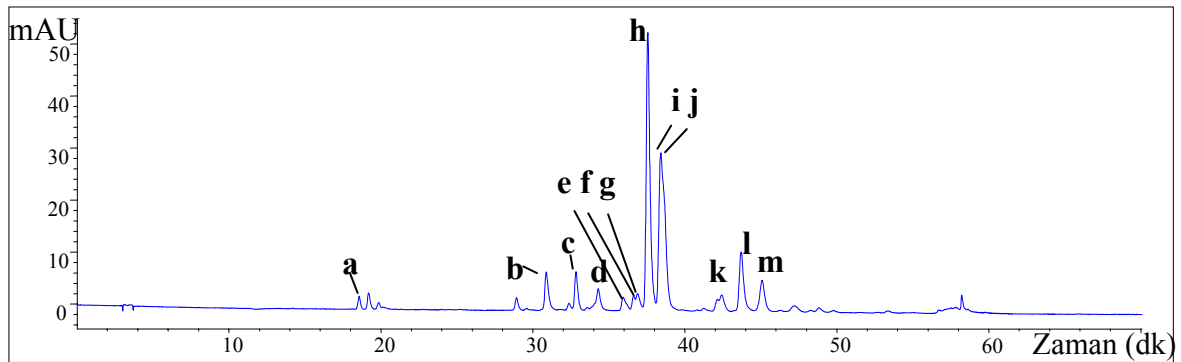


Şekil 21. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un hidrolizlenmiş yaprak (a), çiçek (b) ve sap (c) ekstraktlarının 370 nm'de elde edilen kromatogramları

Hidrolizlenen *P. bistorta* ssp. *carneum* ekstraktlarının 370 nm'deki analiz örnekleri Şekil 21'de gösterilmiştir. Erken elue edilen bileşiklerin neredeyse tamamının hidrolizden sonra kaybolması bir kanıttır (bkz. Şekiller 18-20). Ayrıca alıkonma zamanı ve DAD verileri ile doğrulanan kuersetinin miktarında önemli bir artış vardır. Bu *P. bistorta* ssp. *carneum* ekstraktlarında bulunan bileşiklerin çoğunluğunun gerçekte kuersetin-glikozitler olduğunu gösterir. Fakat yinede flavonol-glikozit standartlarının ilave analiz sonuçlarına sahip olmadığımız için LC-DAD ile esas piklerin tanımlanması problemlidir. Bundan dolayı *P. bistorta* ssp. *carneum* ekstraktlarının esas fenolik bileşiklerinin yapılarını aydınlatma aracı olarak LC-MS incelendi.

3.2.3. Çarpışmadan Kaynaklanan Ayrışma ile LC-MS Tarafından Glikozidik Flavonoidlerin Tanımlanması

P. bistorta ssp. *carneum* metanolik ekstraktlarında mevcut olan fenolik bileşikler standartların alıkonma zamanı ve kütle spektrumları ile literatürde rapor edilen verilerle karşılaştırılarak tanımlandı. Ekstraktların hidrolizden sonra hidroliz edilmeyen numunelerin kromatogramlarında görülen piklerin çoğu kayboldu ve kuersetin ve kamferol pikleri büyüdü (Şekil 21). Bu durum ekstraktlardaki flavonolların esas olarak bu iki bileşiğin glikozidik türevleri olduğunun göstergesidir. Bu flavonol glikozidlerin aydınlatılması için, LC-DAD-MS kullanıldı ve elde edilen kütle spektrumları uygun literatür verileriyle karşılaştırıldı (Tablo 6). Temsilci olarak alınan yaprak ekstraktında 13 şeker bağlı flavonol a'dan m'ye Tablo 6'da gösterilmiştir. Kuersetin ve kamferol aglikonlarından ibaret olan bu flavonollar mevcut yöntemle tanımlanabilir.



Şekil 22. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* yapraklarının ekstraktları için hidrolizden önce 370 nm'de elde edilen kromatogramlar

Tablo 6. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* hidroliz edilmeyen yaprak ekstraktlarının ESI-MS ile çarpışma kaynaklı ayırışma sayesinde tespit edilen moleküler iyon ($[M-H]^-$) m/z değerleri ve başlıca fragmentler

Pik	RT (dk)	Bileşik	$[M-H]^-$	m/z Fragment(ler) (MS tip)	Kaynaklar
a	21,4	Kuersetin-h+ h	625	463,301	I
b	31,2	Kamferol-dh+ h	593	447,285	I
c	33,1	Kuersetin-h +p	595	300	I
d	34,9	Kuersetin-h +p	595	463,301,179,151	I
e	36,1	Kuersetin -dh+ h ^a	609	447,300,271,255,179	I
f	36,5	Kamferol-dh+ h	593	285	I
g	36,8	Kuersetin-dh+h ^b (Rutin)	609	463,300,271,255,179	I, II, III, IV
h	37,9	Kuersetin-h	463	300	I, II, III, V, VI
i	38,6	Kamferol-h	447	285	I, V, VI
j	40,6	Kuersetin-h +CH ₃	477	301	I
k	41,7	Kuersetin -p, Kuersetin-dh veya Kamferol - h	447,433	300,284,255,227,179,151	I
l	43,0	Kuersetin -p	433	300,271,255	I
m	44,0	Kuersetin -dh	447	300,271,255,179,151	I, II, III

h: heksoz; p: pentoz; dh: deoksiheksoz

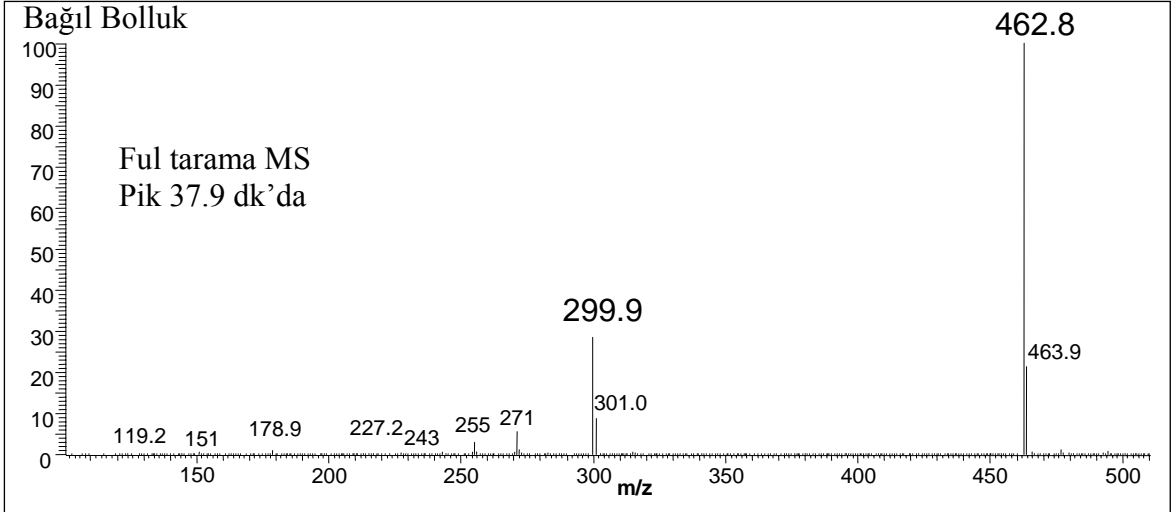
^a ve ^b HPLC'de farklı alıkonma zamanlarına ve farklı MS-MS spektruma sahip m/z 609 olan iki diglikozitlerdir. Daha hızlı elue olan diglikozit (^a) için, 447 MS-MS spektrumunda önce bir heksoz şeker (162) grubunu kaybeden daha güçlü iyondur. Daha yavaş elue edilen diglikozitte (^b), 463 MS-MS spektrumunda önce deoksiheksoz şeker (146) kaybeden en şiddetli piktir.

I: Häkkinen ve Auriola, 1998; II: Alonso-Salces vd., 2004; III: Silva vd., 2005; IV: Sägerser ve Deinzer, 1996; V: Bravo vd., 2006; VI: Carini vd., 2001.

3.2.3.1. Heksozlar

Ekstraktlarda biri kuersetin (H) ve diğeri kamferol (I)'a bağlı heksoz grupları olarak iki heksozlu monoglikozit gözlemlendi. Kuersetin-heksozun kütle spektrumu Şekil 23'de gösterilmiştir.

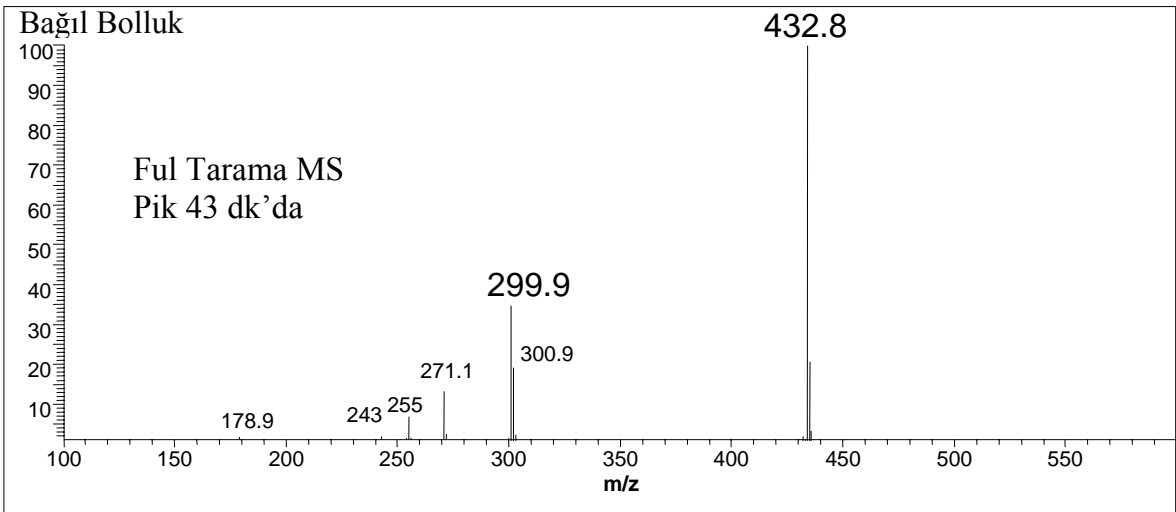
Kuersetin-heksoz 463 akb olan bir $[M-H]^-$ iyonuna ve 37,9 dk alıkonma zamanına sahiptir. 162 akb kütle farkının bir birim heksoz kaybından kaynaklandığı düşünülmektedir (Häkkinen ve Auriola, 1998; Bravo vd., 2006; Carini vd., 2001). m/z 300'e sahip iyon fragmentasyon sırasında oluşan bir kuersetin radikaline karşılık gelir (Petsalo vd., 2006; Hwattum ve Ekeberg, 2003). CID esnasında oluşan birkaç ilave fragment daha düşük m/z'lerle verilmiştir. Spektrumdaki m/z 463,9 ve 301 ilgili iyonun ¹³C izotoplarını temsil eder (Ashcroft, 1997).



Şekil 23. Kuersetin-heksozun %50 çarpışmadan kaynaklanan ayrışma ile elde edilen kütle spektrumu

3.2.3.2. Pentozlar

Potansiyel olarak kuersetin-pentoz (K ve L)'a karşılık gelen iki aday pik gözlemlendi. K pikinde bant genişlemesi mevcut olduğu için bu pik tek bir bileşik olarak tanımlanmadı. Bundan dolayı L piki (Tablo 6) pentozlar için temsilci bir pik olarak seçildi.

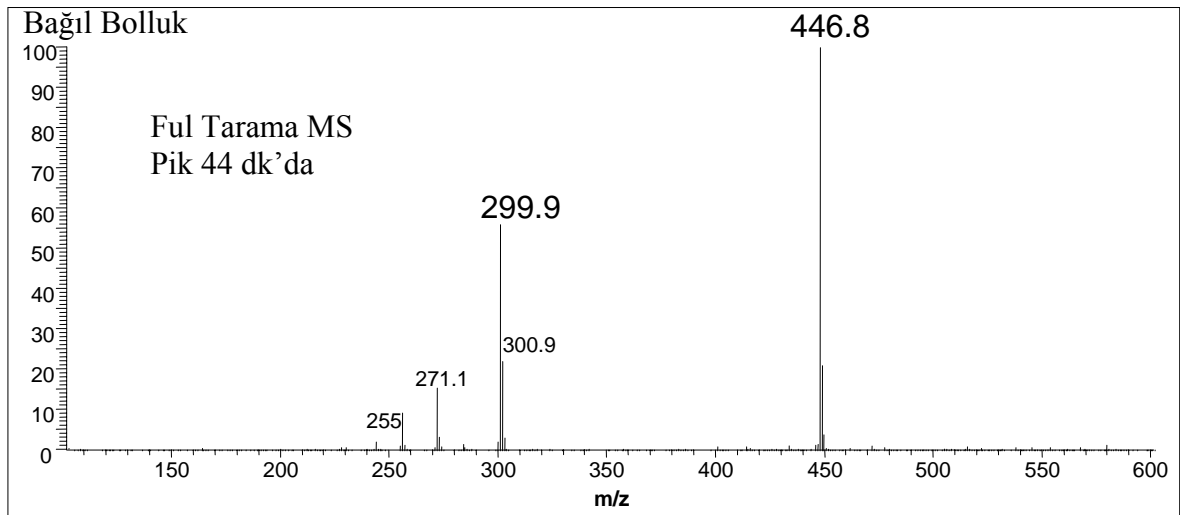


Şekil 24. Kuersetin-pentozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu

433 akb olan moleküler iyonla sahip olan kuersetin-pentoz (elüsyon 43 dk) Şekil 24'te görülebilir. Uygulanan CID'den kaynaklanan 132 akb değerinde kütle farkının bir pentoz grubu olduğu düşünülmektedir (Häkkinen ve Auriola, 1998). 300 akb'de kuersetinin radikal iyonunun kütle spektrumu kuersetinin serbest radikal formuna karşılık gelir. Kuersetinin CID sayesinde ayrıca kendi kendine küçük parçalar halinde fragmentlerine ayrılması Şekil 24'te görülebilir (Prasain vd., 2004).

3.2.3.3. Deoksiheksozlar

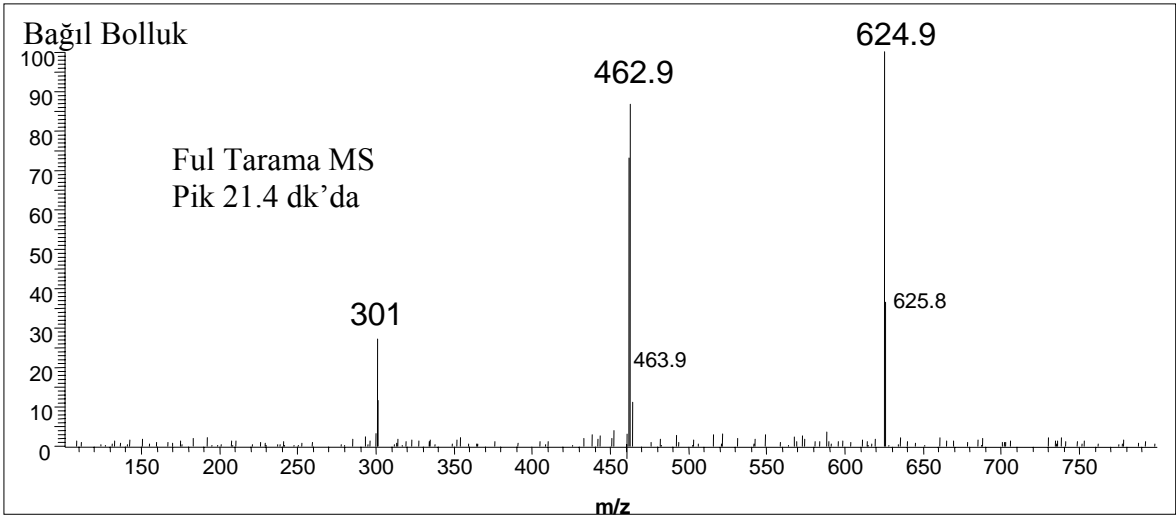
Şekil 22 ve Tablo 6'daki K ve M piklerinin her ikisi de içerdikleri m/z 447 iyonundan dolayı kuersetin-deoksiheksoza karşılık gelebilirler. K piki içerdiği iki ana pikten dolayı açıkça tanımlanmaya müsaade etmez. M piki yalnızca kuersetin-deoksiheksoza karşılık gelen doğru m/z değerini içerir. Kuersetin-heksoz (H) ile karşılaştırıldığında M ve K'nın daha büyük alıkonma zamanına sahip olmaları gerçekte deoksi formunun daha apolar olmasıyla uyumlu bir göstergedir. M piki kromatogramda en son elue edilen piktir (44 dk). Uygulanan CID sonucunda bu sinyalde gözlenen 146 akb fark deoksiheksoz kaybına bağlıdır (Häkkinen ve Auriola, 1998; Alonso-Salces vd., 2004). 300 akb'e karşılık gelen sinyal temelde kuersetinin varlığını gösteriyor ve bazı ilave daha küçük fragmentlerde ayrıca Şekil 25'te gözlenir (Häkkinen ve Auriola, 1998; Alonso-Salces vd., 2004).



Şekil 25. Kuersetin-deoksiheksozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu

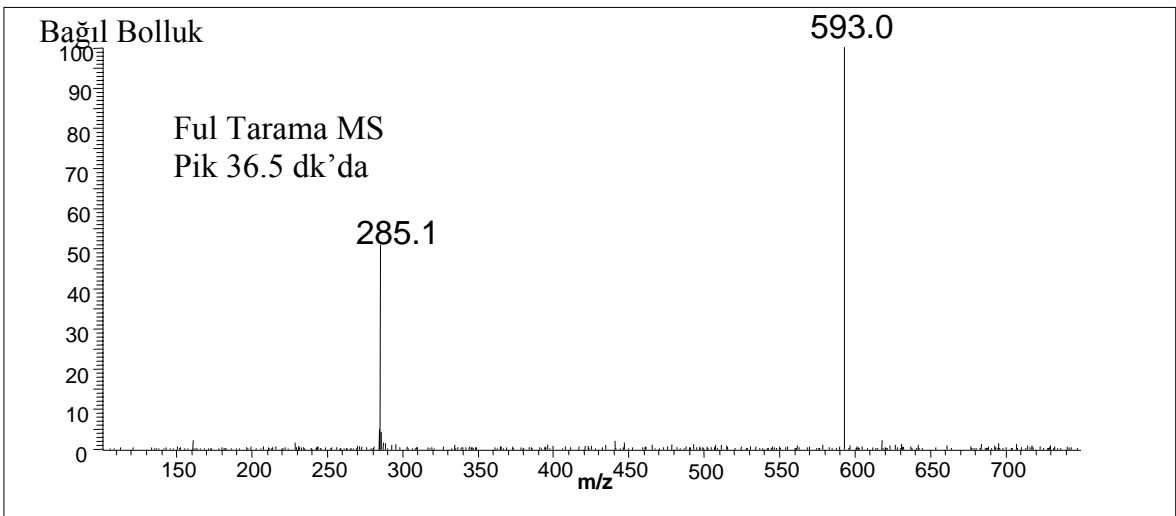
3.2.3.4. Diheksozlar

Kuersetin-diheksoz (A) tespit edilen tek diheksozdu. Kütle spektrumu Şekil 26'da gösterilmiştir. Alıkonma zamanı 21.4 dk olup 625 akb içeren $[M-H]^-$ iyonuna sahiptir. Uygulanan CID sonucunda önce heksoza karşılık gelen 162 akb kaybı görülür ve bu lineer diheksoz modeline uygun olarak aynı kütlede diğer bir heksozun kaybı takip eder (Häkkinen ve Auriola, 1998).



Şekil 26. Kuersetin-diheksozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu

3.2.3.5. Deoksiheksoz + heksoz



Şekil 27. Kamferol-deoksiheksoz+heksozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu

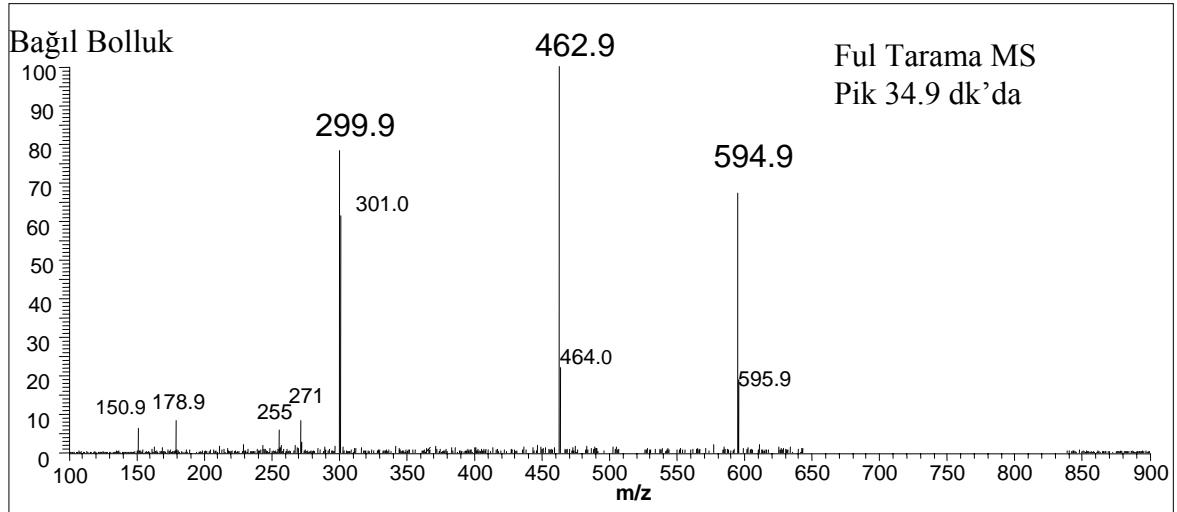
Bir deoksiheksoz+heksoz grubuna bağı dört aglikon tespit edildi. Bunların ikisi kuersetin-deoksiheksoz+heksozu (E ve G) içerir ki bu iki pik bağladıkları şeker birimlerinin bağlanma sırasına göre a ve b olarak ikiye ayrılmıştır. Diğer iki pik ise kamferol-deoksiheksoz+heksoza karşılık gelir (B ve F).

Kamferol-deoksiheksoz+heksoz, bu flavonol glikozitler için bir temsilci bileşik olarak seçildi ve Şekil 27'de gösterildi. F bileşiği 593 akb'ye ait bir moleküler iyonla 36.5 dk alıkonma zamanına sahiptir. 593 ile fragment iyon 285 arasındaki kütle farkı 308 akb'nin hem heksoz hem de deoksiheksoz olması beklenir (Häkkinen ve Auriola, 1998).

3.2.3.6. Heksoz + pentozlar

İki kuersetin-heksoz+pentoz flavonol glikozit Tablo 6'da görüldüğü gibi tespit edildi (C ve D bileşikleri). D pikinin 34.9 dk'da gözlenen MS spektrumu Şekil 28'de gösterilmiştir.

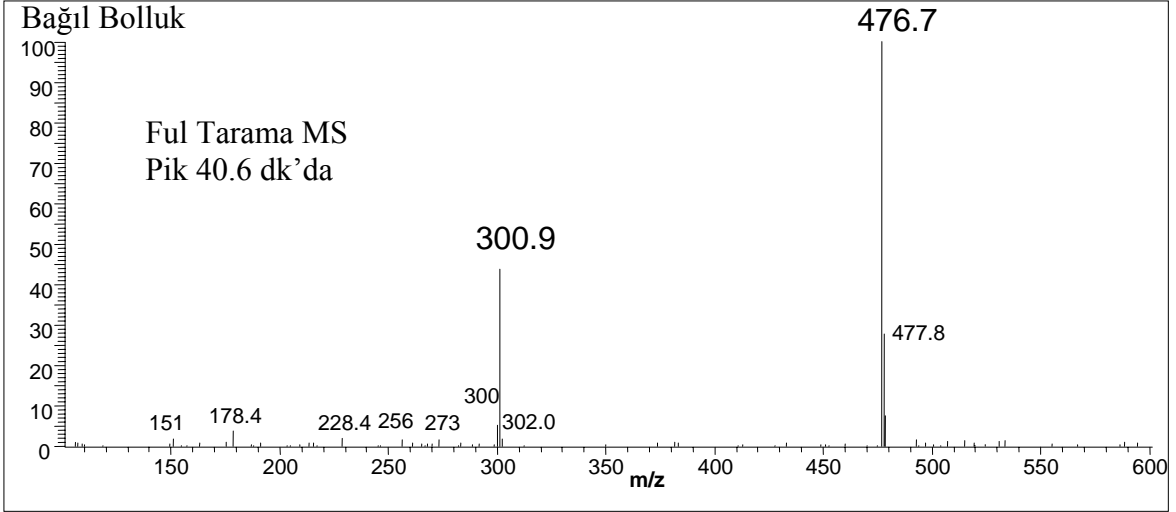
Moleküler iyon 595 m/z'e sahiptir. 294 akb kaybı (162 ve 132) sırasıyla heksoz ve pentoz kaybını açıklar (Häkkinen ve Auriola, 1998).



Şekil 28. Kuersetin-heksoz+pentozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu

3.2.3.7. Heksoz + CH₃

Kuersetinin bir heksoz ve metil türevi tespit edildi (J). 40.6 dk'da 477 akb molekül ağırlığına sahip pikin ilk fragmenti 301 akb'dir. 176 akb kaybı bir heksoz ve bir metil grubuna karşılık gelir (Şekil 29).



Şekil 29. Kuersetin-heksoz+CH₃'ün %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu

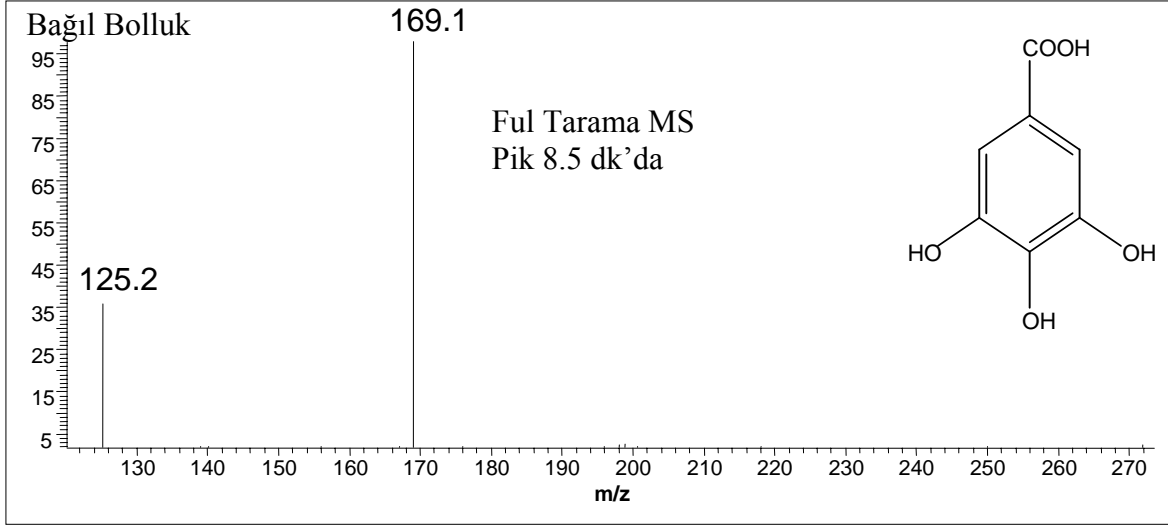
3.2.4. MS ve Uygun Standartlarla Karşılaştırarak İlave Flavonoidlerin Tanımlanması

P. bistorta ssp. *carneum*'un yapraklarının ekstraktında hidrolizden dolayı HPLC-DAD kromatogramlarında kaybolan pikler (Şekil 21) flavonol-glikozitler olarak tanımlandı. Fakat yine de farklı hidroliz edilmeyen ekstraktlarda pek çok ilave fenolik bileşikler LC-MS tarafından tespit edildi. Tüm ekstraktlarda bu bileşiklerin bir listesi Tablo 7'de gösterilmiştir.

Gallik asit (pik 1), protokatekuik asit (pik 2), kateşin (pik 3), epikateşin (pik 8), rutin (pik 11) ve kuersetin (pik 12) kütle spektrometri ve standartların alıkonma zamanları ile karşılaştırarak tanımlandı (bkz Tablo 7 ve Şekil 30-35). İlgili kütle spektrumları aşağıda gösterilmiştir.

3.2.4.1. Gallik Asit

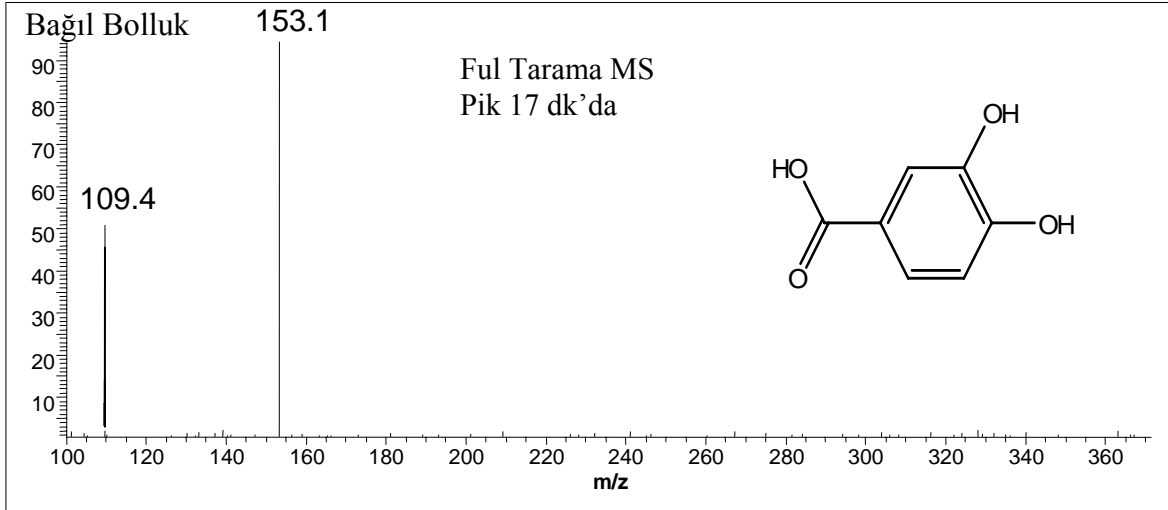
Gallik asit 8.5 dk alıkonma zamanına ve 169 akb'li bir negatif moleküler iyon [M-H]⁻'a sahiptir (Bravo vd., 2006; Zywicki vd., 2002). Moleküler iyon ve ilk fragment arasındaki 44 akb kaybı gallik asitin dekarboksilasyonuna karşılık gelir (Şekil 30).



Şekil 30. Gallik asitin CID'siz kütle spektrumu. Yapısı spektruma eklenmiştir

3.2.4.2. Protokatekuik Asit

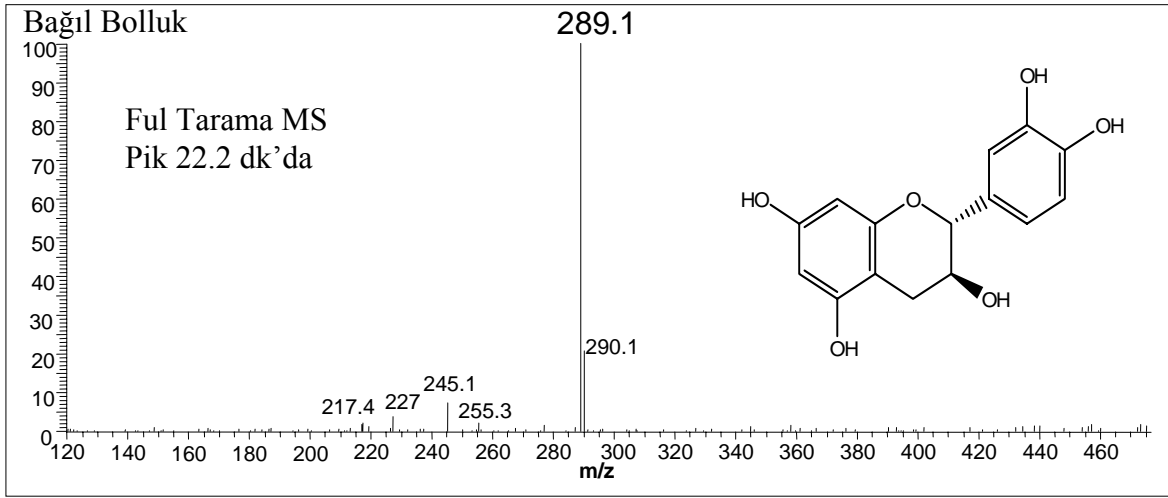
Protokatekuik asit 17 dk alıkonma zamanına ve 153 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Bravo vd., 2006). 153 m/z ve 109 m/z arasındaki 44 akb kaybı protokatekuik asidin dekarboksilasyonuna karşılık gelir.



Şekil 31. Protokatekuik asitin CID'siz kütle spektrumu . Yapısı spektruma eklenmiştir

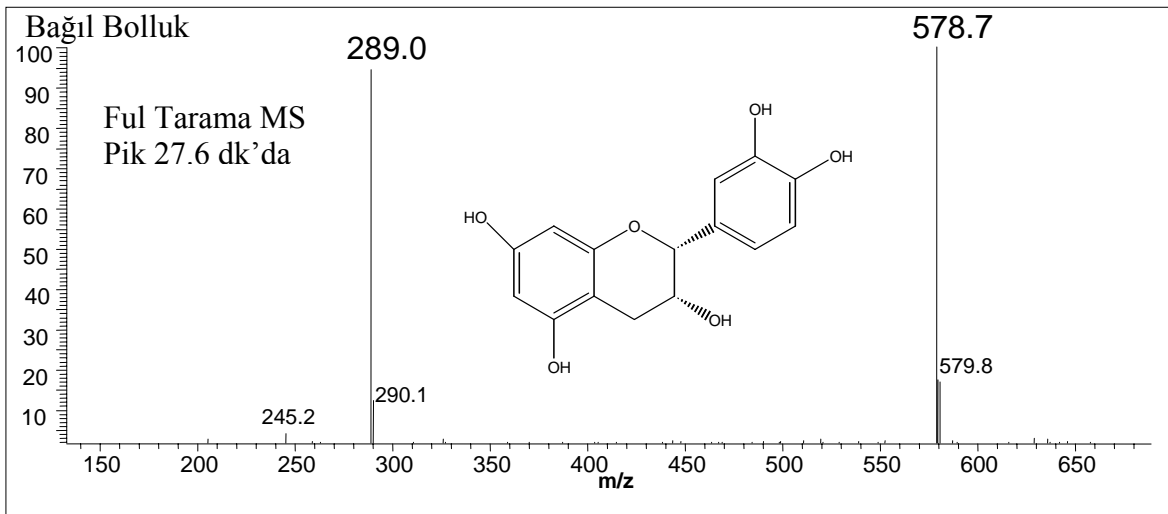
3.2.4.3. Kateşin

Kateşin 22.2 dk alıkonma zamanına ve 289 akb'li bir $[M-H]^-$ iyonuna sahiptir (Şekil 32) (Borbalán vd., 2003; Alonso-Salces vd., 2004; Bravo vd., 2006; Zywicki vd., 2002). 289 ve 245 arasındaki 44 akb farkının C halkasından C_3 deki hidroksil grubuyla birlikte C_3 ve C_4' den $-CH_2-CHOH-$ grubunun kaybından kaynaklandığı düşünülür ($[M-45]$) (Borbalán vd., 2003; Bravo vd., 2006).



Şekil 32. Kateşinin CID'siz kütle spektrumu. Yapısı spektruma eklenmiştir

3.2.4.4. Epikateşin

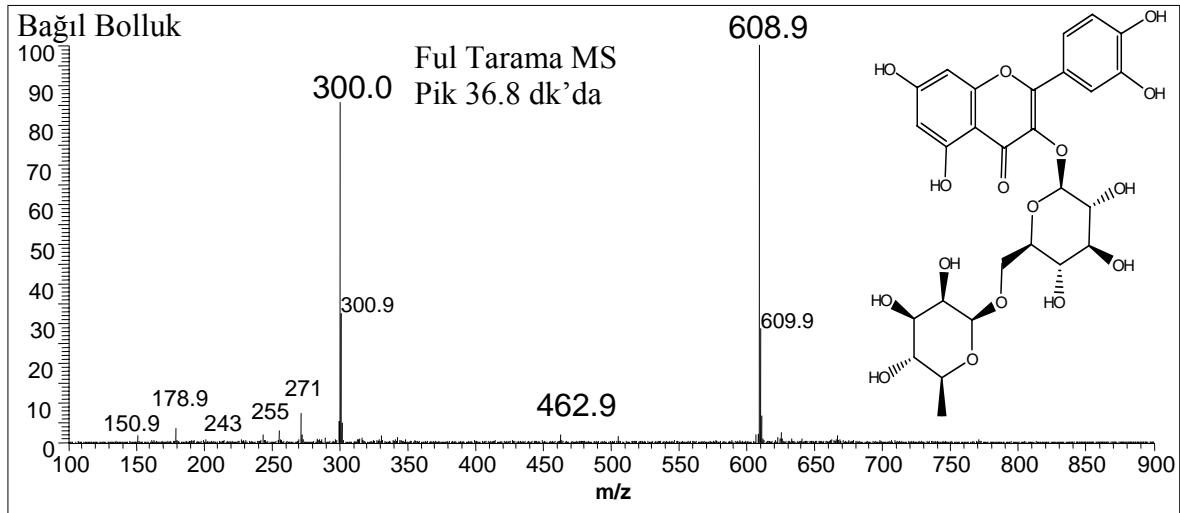


Şekil 33. Epikateşinin CID'siz kütle spektrumu. Yapısı spektruma eklenmiştir

Epikateşin 27.6 dk alıkonma zamanı ve 289 akb'li bir negatif moleküler iyon $[M-H]^-$ a sahiptir (Borbalán vd., 2003; Alonso-Salces vd., 2004; Bravo vd., 2006; Zywicki vd., 2002). 289 ve 245 arasındaki 44 akb farkının C halkasından C₃ deki hidroksil grubuyla birlikte C₃ ve C₄'ten $-CH_2-CHOH-$ grubunun kaybından kaynaklandığı düşünülür ($[M-45]^-$) (Borbalán vd., 2003; Bravo vd., 2006). m/z 597 olan en bol iyon $[2M-H]^-$ dimere karşılık gelir.

3.2.4.5. Rutin

Çeşitli ekstraktlarda iki kuersetin-deoksiheksoz-heksoz yapı tipi çok yakın ilgili alıkonma zamanlarıyla (sırasıyla 36.1 dk ve 36.8 dk) tespit edildi. Daha geç elue edilen pik rutine karşılık gelir ve bu uygulanan CID'den dolayı görülen karakteristik fragmentler sayesinde de doğrulanır (Tablo 7). Fragment iyon m/z 463, bu pikin rutin olduğunu gösterir (Şekil 30 ve Tablo 3) (Sägesser ve Deinzer, 1996).

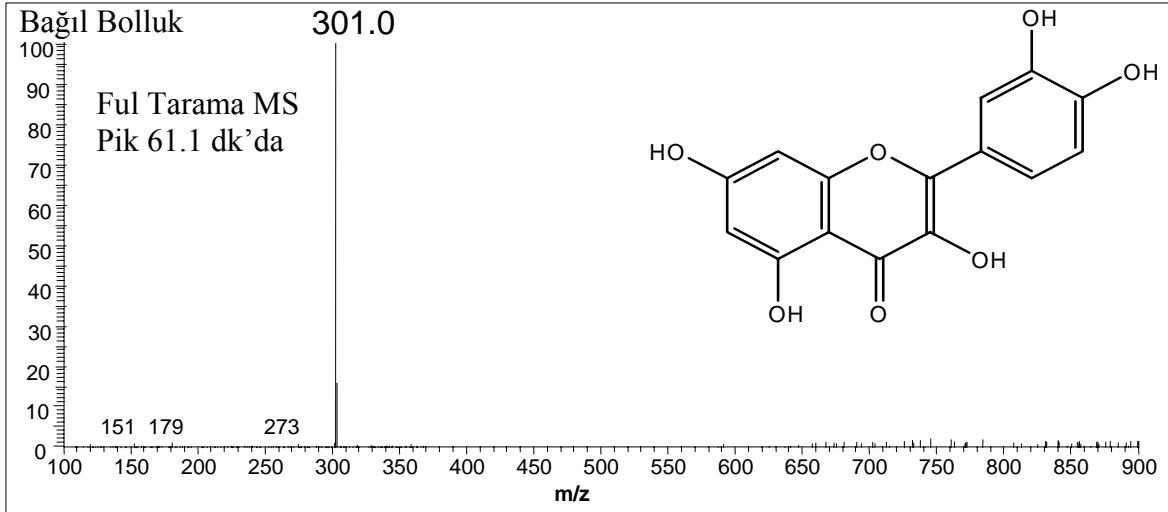


Şekil 34. Rutinin CID ile elde edilen kütle spektrumu. Yapısı spektruma eklenmiştir

3.2.4.6. Kuersetin

Kuersetin 61.1 dk'da alıkonma zamanı ve 301 akb olan negatif moleküler iyon $[M-H]^-$ a sahiptir.

Bu bilgi ayrıca Tablo 7'de verilmiştir. Çeşitli ekstraktlarda aşağıdaki bileşiklerin varlığı ya da yokluğu Tablo 8'de mevcuttur.



Şekil 35. Kuersetinin CID ile elde edilen kütle spektrumu. Yapısı spektruma eklenmiştir

Tablo 7. Hidroliz olmayan ekstraktlarda flavonoidlerin $[M-H]^-$ iyonlarının m/z değerlerinin tanımlanması. 1-10, 19-22 CID uygulanmaksızın, 11-18 CID uygulanarak tespit edildi

No	R T (dk)	Bileşik	$[M-H]^-$	m/z fragment(ler) (MS tip)	Kaynaklar
1	8,5	Gallik asit	169	125	V, VII
2	17.0	Protokatekuik asit	153	109	V
3	19.5	Prosiyanidin dimer	577	289	II, VIII, V, IX
4	22.2	Kateşin	289	245	X, II, V, VII
5	22.6	Klorogenik asit	707	353	VI
6	23.3	Prosiyanidin dimer	577		II, VIII, V, IX
7	23.7	Klorogenik asit	707	353	VI
8	24.2	Klorogenik asit	707	353	VI
9	27.2	Klorogenik asit	353	191,179	VI
10	27.6	Epikateşin	579	289,245	X, II, V, VII
11	36.1	İsorhamnetin-deoksiheksoz+heksoz	623		II
12	39.6	İsorhamnetin -heksoz+pentoz	609	315	II
13	41.3	İsorhamnetin-deoksiheksoz+heksoz	623	315	II
14	42.9	İsorhamnetin-deoksiheksoz+heksoz	623	315	II
15	43.5	İsorhamnetin -heksoz	477	315	IX
16	44.5	İsorhamnetin -heksoz	477	315	IX

Tablo 7'nin devamı

No	R T (dk)	Bileşik	[M-H] ⁻	m/z fragment(ler) (MS tip)	Kaynaklar
17	45.4	Apigenin-heksoz	431	269	VI, XI
18	49.2	Apigenin -heksoz	431	269	VI, XI
19	61.1	Kuersetin	301		XII, V,I
20	61.6	İsorhamnetin	315		II
21	63.6	Kamferol	285		XII, I
22	64	Apigenin	269		XII, XI

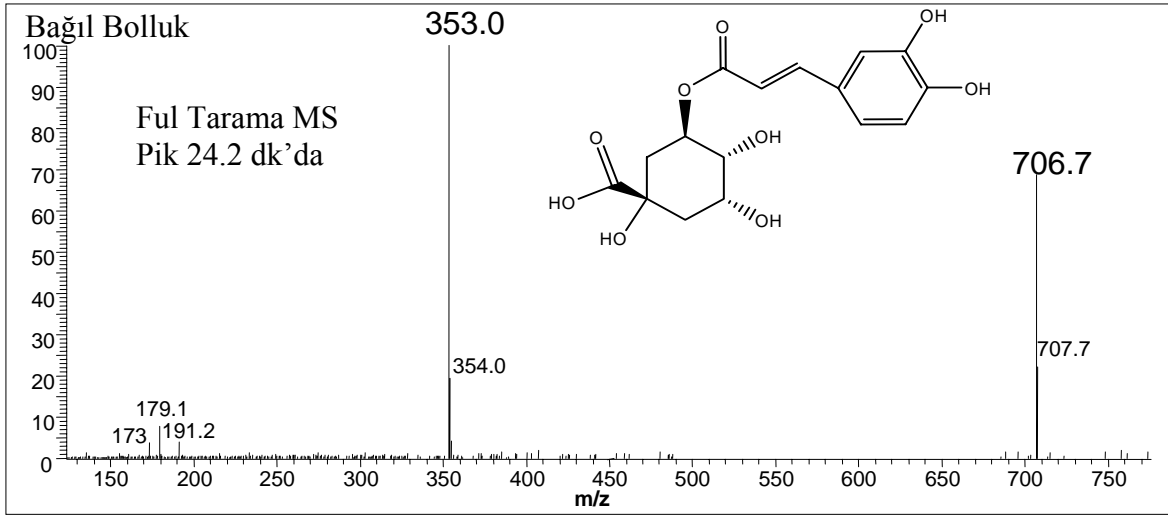
II: Alonso-Salces vd., 2004; V: Bravo vd., 2006; VI: Carini vd., 2001; VII: Zywicki vd., 2002; VIII: Benavides vd., 2006; IX: Cantos vd., 2002; X: Borbalán vd., 2003; XI: Hwattum ve Ekeberg, 2003; XII: Fabre vd., 2001.

3.2.5. Yalnızca Kütle Spektrometresi Tarafından İlave Flavonoidlerin Tanımlanması

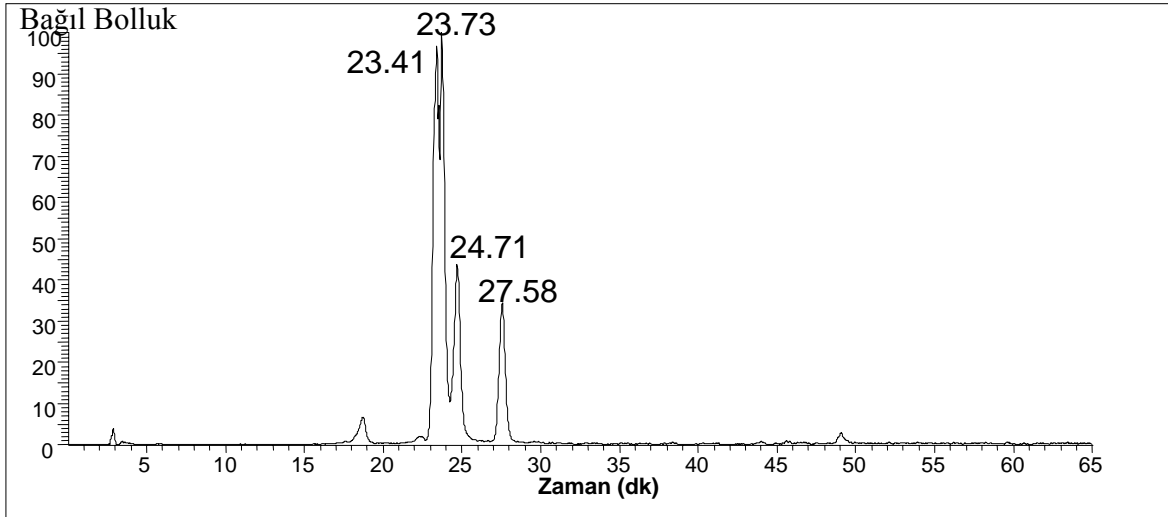
Çeşitli ekstraktlarda standartlar ile aydınlatılmaları uygun olan bileşiklerin bu listesinin yanında UV spektrumunda standartlar ile aydınlatılmaları uygun olmayan ve görülmeyen bazı ilave flavonoidler CID ile ya da CID'siz LC-MS'de ekstrakte edilmiş iyon kromatografi sayesinde tanımlanabilirler. Bu sonuçlar ve ilgili kütle spektrumları aşağıda gösterilmiştir. Klorogenik asitler (Şekil 37) ve isorhamnetin-deoksiheksoz-pentoz (Şekil 40) için temsilci ekstrakte edilen iyon kromatogramları gösterilmiştir.

3.2.5.1. Klorogenik Asit

Klorogenik asidin m/z 353 akb olan dört negatif moleküler iyon ([M-H]⁻) ve/veya dimer [2M-H]⁻ pikleri çeşitli alıkonma zamanlarında farklı numunelerin kromatogramları boyunca gözlemlendi. Bu durum ekstraktlarda bulunan klorogenik asitin çeşitli yapısal izomerlerine işaret eder, fakat onlar burada kullanılan tekniklerle farkedilemezler. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un ekstrakte edilen iyon kromatogramında bu molekül ağırlığına sahip yalnızca dört pik tespit edildi. Bu ekstrakte edilen iyon kromatogramı Şekil 37'de ve klorogenik asit için seçilen temsili MS spektrumu ise Şekil 36'da gösterilmiştir.



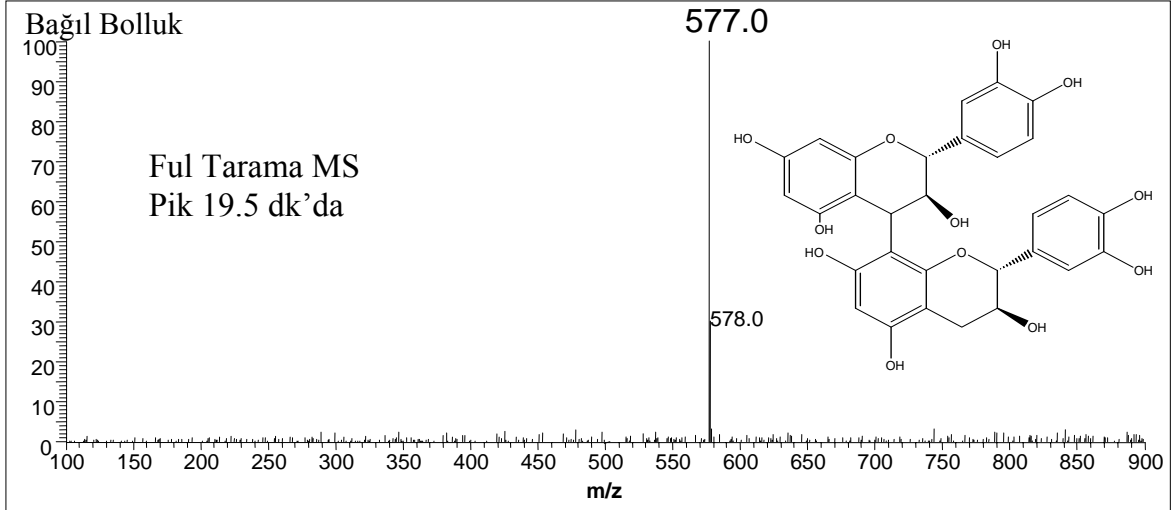
Şekil 36. Klorojenik asidin CID'siz kütle spektrumu. Yapısı spektruma eklenmiştir



Şekil 37. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak ekstraktlarında gözlenen klorojenik asit (m/z 353 akb) için ekstrakte iyon kromatogramı

3.2.5.2. Prosiyanidin Dimer

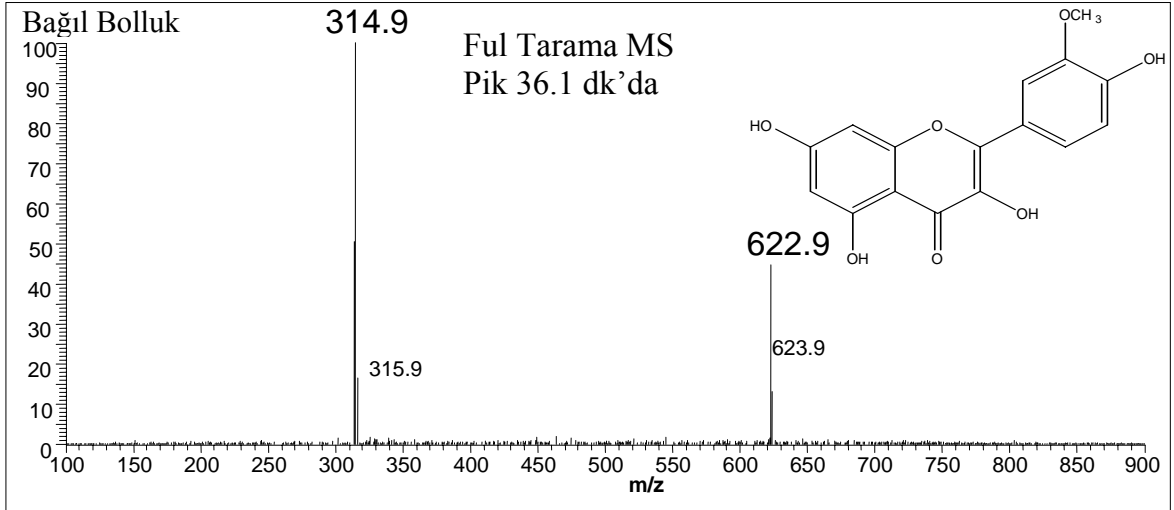
Prosiyanidin dimer için beklenen iyonun (m/z 577 akb) ekstrakte iyon kromatogramından çeşitli numunelerde dört pik gözlemlendi. Şekil 38'de gösterilen kütle spektrumu 19.5 dk'da elue edilen pike karşılık gelir (Zywicki vd., 2002; Benavides vd., 2006).



Şekil 38. Prosiyanidin dimerin CID uygulanmaksızın elde edilen kütle spektrumu. Yapısı spektruma eklenmiştir

Yine bu durum ekstraktlarda bulunan ve burada kullanılan tekniklerle farklıdırılmayan prosiyanidinin çeşitli yapısal izomerlerine işaret eder.

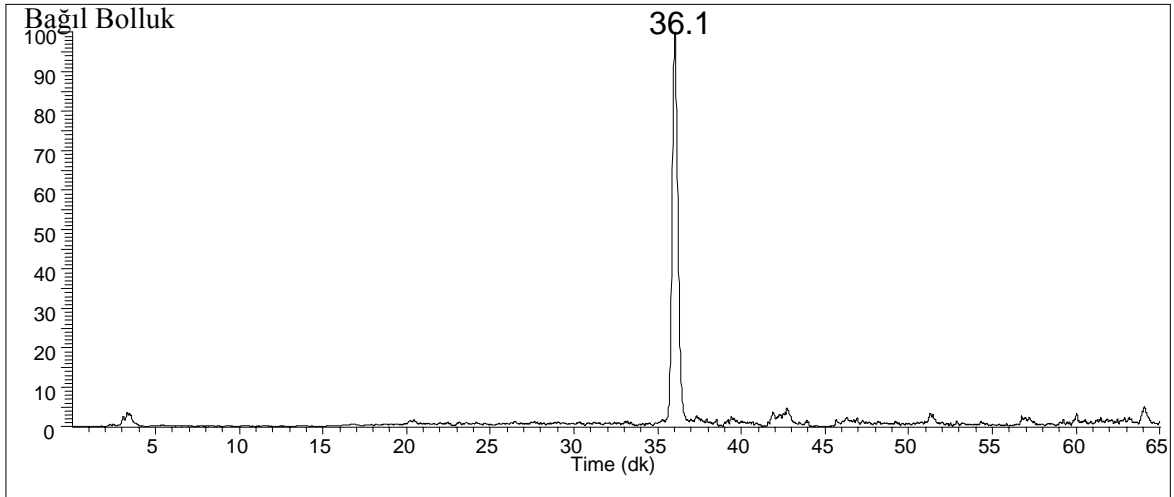
3.2.5.3. İsorhamnetin-deoksiheksöz + heksoz



Şekil 39. İsorhamnetin-deoksiheksöz+heksozun %50 CID uygulanarak elde edilen kütle spektrumu. İsorhamnetinin yapısı spektruma eklenmiştir

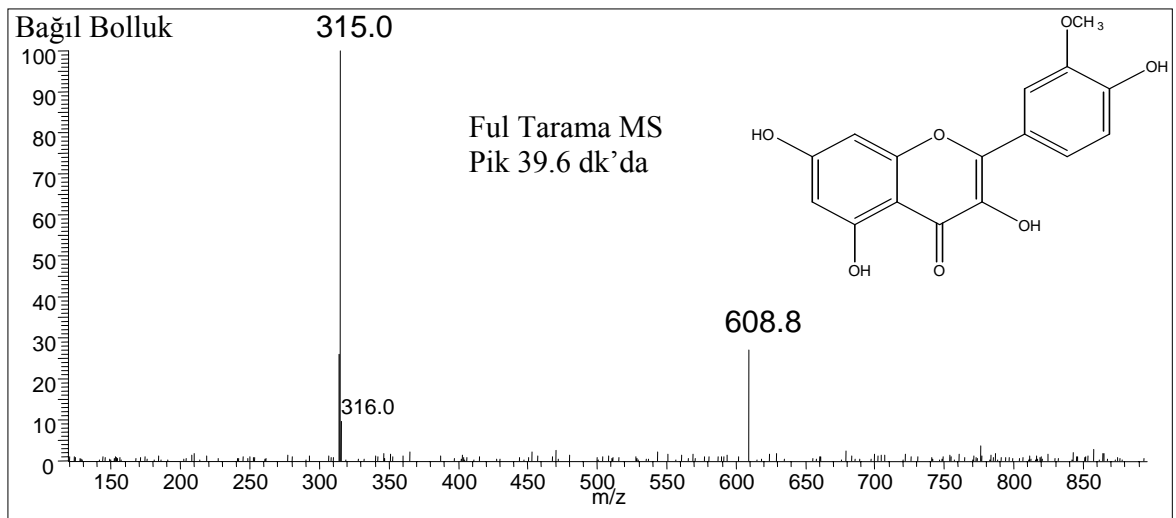
36.1 dk'da elue edilen pikin kütle spektrumu Şekil 39'da gösterilmiştir. 622.9 akb'e sahip kütle spektrumu isorhamnetin-deoksiheksöz-heksoz için beklenen iyon karşılık

gelir. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un çiçek ekstraktında bu kütle için ekstrakte edilen iyon kromatogramı Şekil 40'ta gösterilmiştir. %50 CID'de fragmentasyon işlemi sayesinde bu tanımlama doğrulanır. Moleküler iyon ve ilk fragment arasındaki 308 akb'lik kütle farkının deoksiheksoz (146 akb) ve heksoz (162 akb) kaybından kaynaklandığı düşünülmüştür (Alonso-Salces vd., 2004).



Şekil 40. *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un çiçek ekstraktlarında gözlenen isorhamnetin (623 akb) için ekstrakte edilen iyon kromatogramı

3.2.5.4. İsorhamnetin-heksoz + pentoz

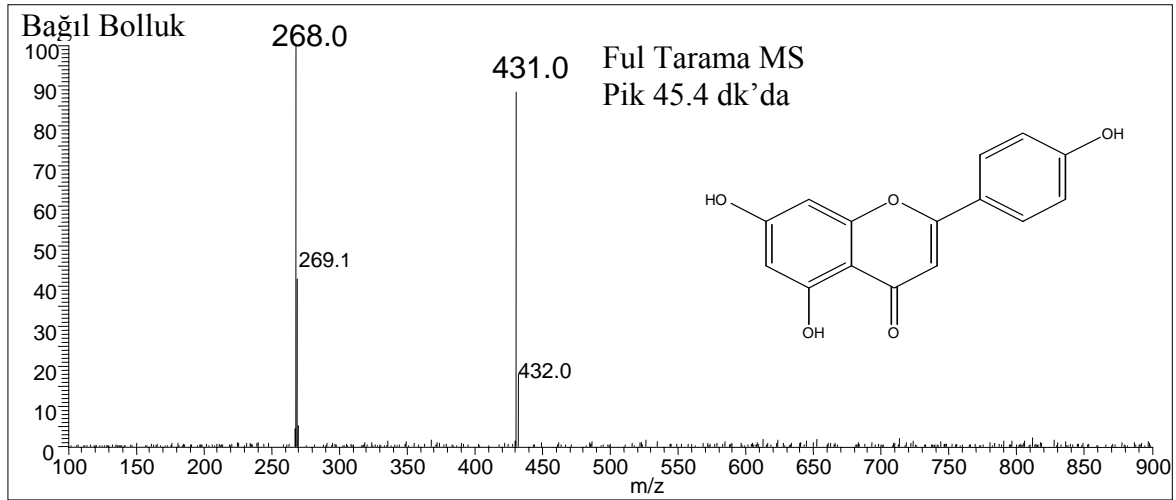


Şekil 41. İsorhamnetin-heksoz+pentozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu. İsorhamnetinin yapısı spektruma eklenmiştir

İsorhamnetin-heksoz+pentozun moleküler ağırlığına karşılık gelen kütle spektrumu Şekil 41’de gösterilmiştir. Uygulanan %50 CID sayesinde gözlenen 294 akb kütle kaybı heksoz ve pentoz birimlerinin kaybına karşılık gelir (Häkkinen ve Auriola, 1998; Alonso-Salces vd., 2004).

3.2.5.5. Apigenin-heksoz

P. bistorta ssp. *carneum*’un yaprak ekstraktının ekstrakte edilen iyon kromatogramında iki apigenin-heksoz piki görüldü. 45.4 dk’da elue edilen pike karşılık gelen kütle spektrumu Şekil 42’de gösterilmiştir.



Şekil 42. Apigenin-heksozun %50 CID ile elde edilen kütle spektrumu. Apigeninin yapısı spektruma eklenmiştir

431 akb’ye sahip moleküler iyon apigenin-heksozlardan birine karşılık gelir (Carini vd., 2001; Hwattum ve Ekeberg, 2003). Uygulanan %50 CID sayesinde oluşan 162 akb kaybı bir heksoz şekere karşılık gelir. Ayrıca apigenin $[M-H]^-$ nin serbest radikal fragmenti de görülebilir (Hwattum ve Ekeberg, 2003).

Tablo 8’te bu bölümde tanımlanan moleküller için tüm ekstraktlar kalitatif açıdan incelenmiştir.

Tablo 8. Bitki ekstraktlarında tespit edilen fenolik bileşikler

Bileşik Harf sembolleri ve Numaraları	Ekstraktlar		
	110YM	110CM	110SM
(a) Kuersetin-heksoz+heksoz	x	—	x
(b) Kamferol- deoksiheksoz - heksoz	x	—	x
(c) Kuersetin- heksoz +pentoz	x	x	x
(d) Kuersetin- heksoz +pentoz	x	x	x
(e) Kuersetin- deoksiheksoz + heksoz ^a	x	x	x
(f) Kamferol - deoksiheksoz + heksoz	x	—	—
(g) Kuersetin - deoksiheksoz + heksoz ^b (rutin)	x	x	x
(h) Kuersetin - heksoz	x	x	x
(i) Kamferol - heksoz	x	—	x
(j) Kuersetin - heksoz +CH ₃	x	x	x
(k)Kuersetin -pentoz, Kuersetin -deoksiheksoz veya Kuersetin - heksoz	x	x	x
(l) Kuersetin -pentoz	x	x	x
(m) Kuersetin - deoksiheksoz	x	x	x
(1) Gallik asit	x	x	—
(2) Protokatekuik asit	x	x	x
(3) Prosiyanidin dimer	—	x	x
(4) Kateşin	—	x	—
(5) Klorogenik asit	x	x	x
(6) Prosiyanidin dimer	—	x	—
(7) Klorogenik asit	x	x	x
(8) Klorogenik asit	x	x	x
(9) Klorogenik asit	x	x	x
(10) Epikateşin	x	x	x
(11) İsorhamnetin- deoksiheksoz + heksoz	—	x	—
(12) İsorhamnetin - heksoz +pentoz	—	—	x
(13) İsorhamnetin - deoksiheksoz + heksoz	x	—	x
(14) İsorhamnetin -deoksiheksoz + heksoz	x	—	x
(15) İsorhamnetin - heksoz	x	—	x
(16) İsorhamnetin - heksoz	x	—	x
(17) Apigenin- heksoz	x	—	x
(18) Apigenin- heksoz	x	—	x
(19) Kuersetin	x	x	x
(20) İsorhamnetin	x	x	x
(21) Kamferol	x	x	x
(22) Apigenin	x	—	x

110YM, 110CM ve 110SM sırasıyla *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak, çiçek ve sap ekstraktlarıdır.

x: gözlendi

—: gözlenmedi

Demirezer vd. (2000) nin *Polygonum bistorta* ssp. *carneum* üzerine yaptıkları bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstraktlarında, kuersetin 3-*O*- β -D-glukuronopiranozit, kuersetin-3-*O*- α -L-ramnopiranozit, kuersetin-3-*O*- β -D-galaktopiranozit, kamferol-3-*O*- α -L-ramnopiranozit ve kateşin izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik ve kromatografik yollarla aydınlatılmıştır. Mevcut çalışmada bu flavonoller tespit edilmiş fakat flavonol-glikozit standartlarının ilave analiz sonuçlarına sahip olunmadığından hangi şekerlerin bağlı olduğu tespit edilememiştir.

Data vd. (2000) nin *Polygonum viscosum*'un tüm kısımlarında yaptıkları bir çalışmada metanol ekstraksiyonuyla kuersetin 3-*O*-(6"-galloil)- β -D-galaktozit izole edilmiş ve yapısı UV ve NMR teknikleriyle belirlenmiştir.

Calis vd. (1999) nin *Polygonum salicifolium*'un flavonoid glikozitleri üzerine yapılan bir çalışmada altı tane bilinen flavonoid glikozit; kamferol-3-*O*- β -D-glikopiranozit (astragalin), kamferol-3-*O*- β -D-galaktopiranozit, kuersetin-3-*O*- β -D-glikopiranozit (izokuersitrin), kuersetin-3-*O*- β -D-galaktopiranozit (hiperozit), kuersetin-3-*O*-(2"-*O*-galloil)- β -D-glikopiranozit ve kuersetin-3-*O*- β -D-glikopiranozit *Polygonum salicifolium*'un rizomlarından izole edilmiş ve yapılar UV, IR, ESI-MS, 1D- ve 2D-NMR gibi yöntemlerle aydınlatılmıştır.

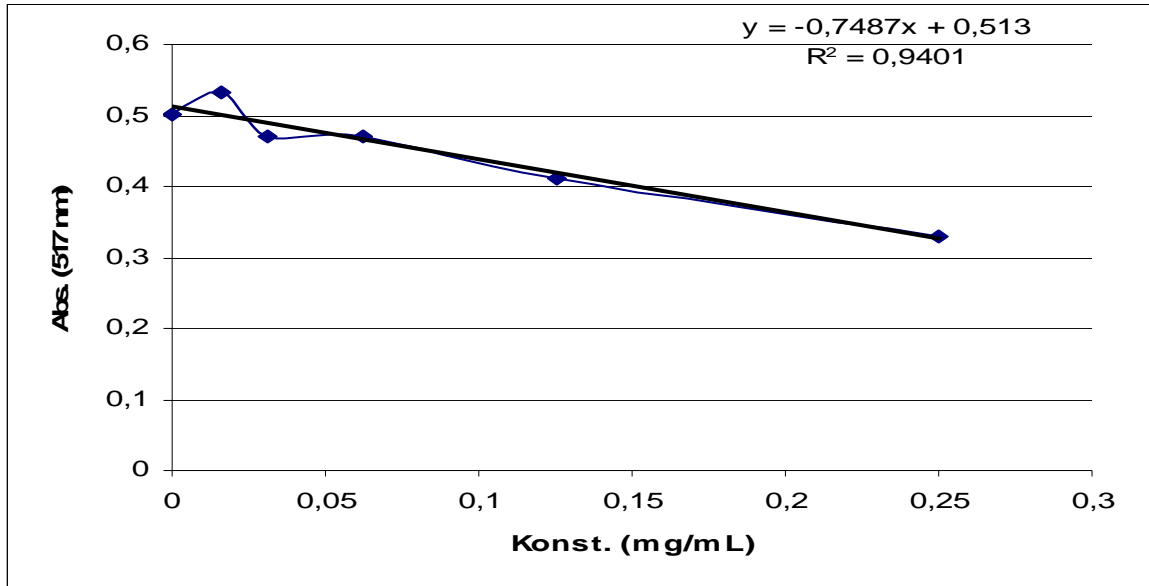
Smolarz (2002) nin yaptığı bir çalışmada iki asetillenmiş flavonoid glikozit: kuersetin-3-*O*- β -D-glukuronid, kuersetin-3-*O*- β -D-glukopiranozit, kuersetin-3-*O*- β -D-galaktopiranozit, kuersetin-3-*O*- α -L-ramnopiranozit, kuersetin-3-*O*-ramnoglukozit, kamferol-3-*O*-D-glukopiranozit, kuersetin, kamferol ve taksifolin ile birlikte kuersetin-3-*O*- β -D-(6?-*O*-galloil)-glikopiranozit ve kuersetin-3-*O*- β -D-(6?-*O*-galloil)-galaktopiranozit *Polygonum lapathifolium* ssp *tomentosum* (Schrank) Dans'ın toprak üstü kısmından izole edilmiş ve bileşiklerin yapıları kimyasal ve spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir.

Smolarz vd. (2003) nin *Polygonum amphibium* L. üzerine yaptıkları bir çalışmada kuersetin-3-metil eterin yanı sıra *trans*-taksifolin, kuersetin ve kamferol izole edildi ve izole edilen bileşiklerin yapısı UV, ¹H NMR, ¹³C NMR ve CI-MS gibi spektroskopik yöntemlerle tayin edildi.

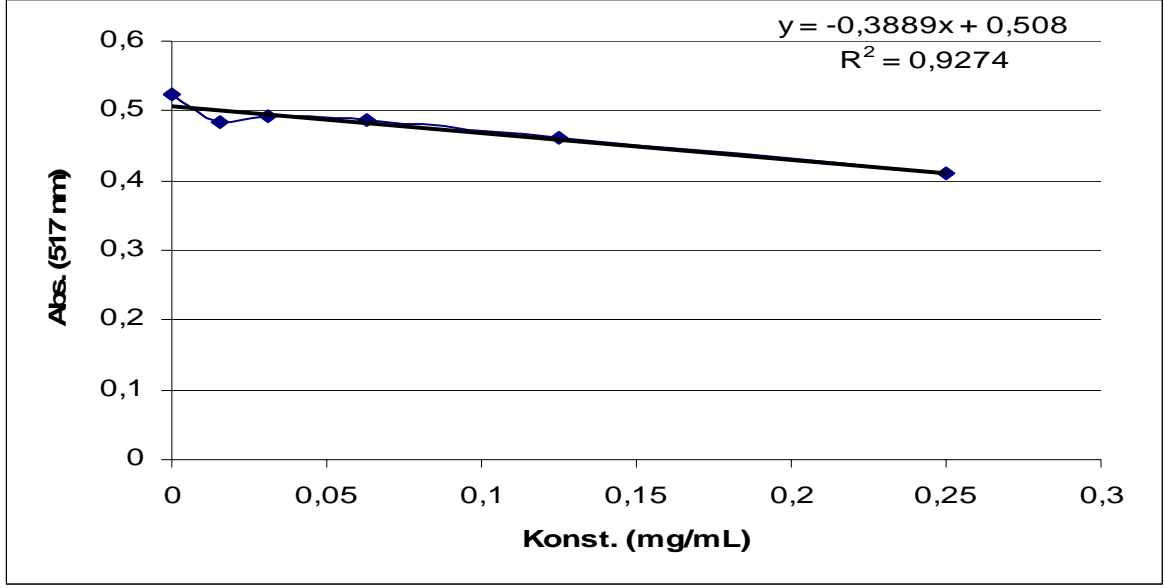
Aynı cinsin farklı türleri üzerine yapılan bu çalışmalarda mevcut çalışma ile benzer olarak kuersetin ve kamferol tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bu sonuçlara dayanarak genel olarak *Polygonum*'un kuersetin ve kamferol flavonollerini içerdiğini söyleyebiliriz.

3.3. Antioksidan Aktivite: DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri

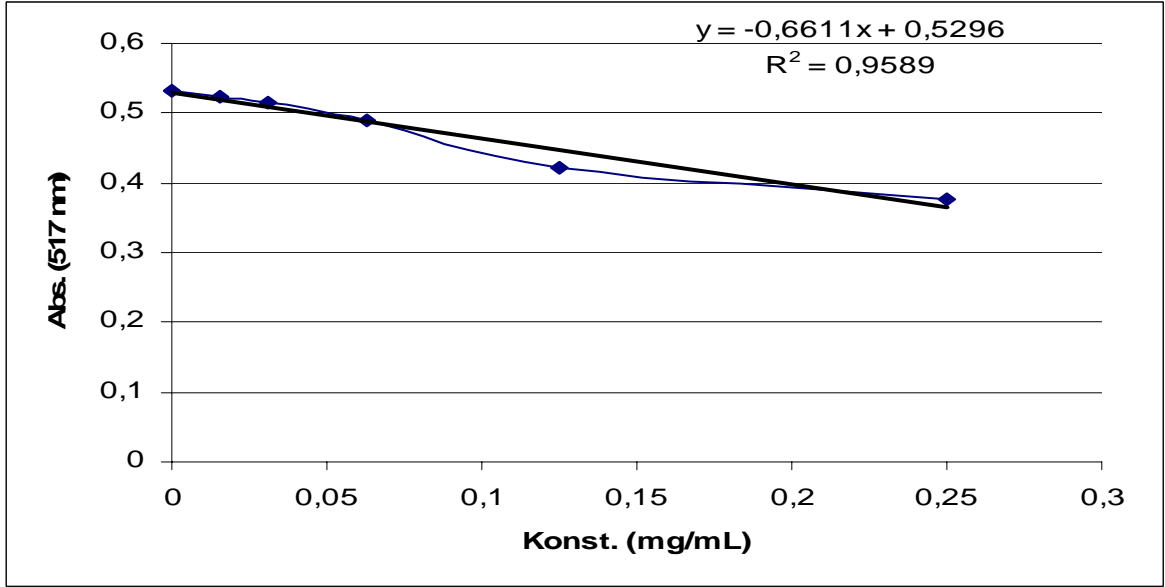
DPPH• radikali temizleme yöntemine belirlenen numune antioksidan kapasiteleri Şekil 43-51'den elde edilerek belirlenmiştir. Artan numune konsantrasyonuna karşı 517 nm'deki absorbanslar grafiğe geçirilerek elde edilen grafikler kullanılarak antioksidan kapasiteler kantitatif olarak ifade edilmiştir. Antioksidan aktivite, numunelerin IC₅₀ değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır (Şekil 52). IC₅₀, başlangıç DPPH• radikal konsantrasyonunu (kontrolün absorbansını) yarıya düşüren numune konsantrasyonudur ve genellikle mg/mL ya da mM olarak ifade edilmektedir.



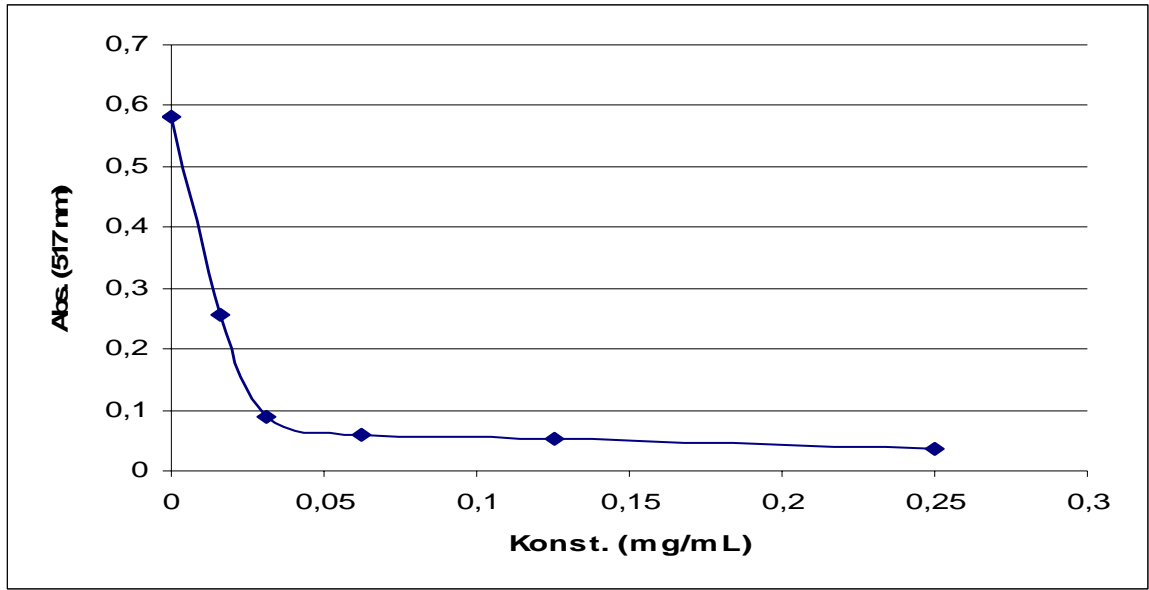
Şekil 43. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak kısmının kloroform ekstraktının (110YK) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC₅₀) olarak ifade edildi (IC₅₀ = 0.3426 mg/mL)



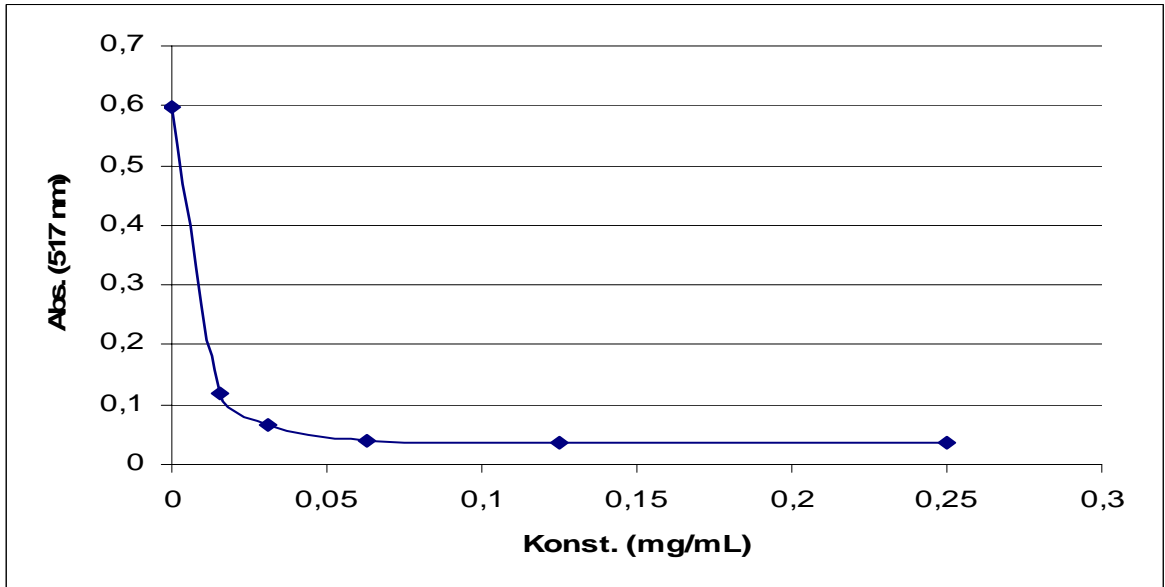
Şekil 44. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un çiçek kısmının kloroform ekstraktının (110CK) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edildi ($IC_{50} = 0.6531$ mg/mL)



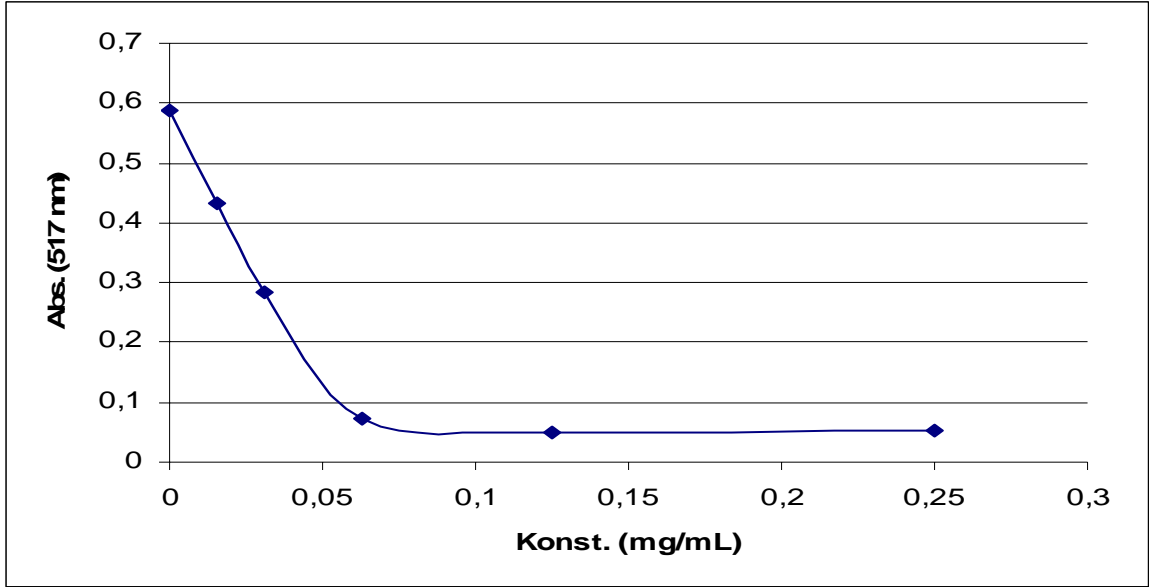
Şekil 45. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un sap kısmının kloroform ekstraktının (110SK) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edildi ($IC_{50} = 0.4005$ mg/mL)



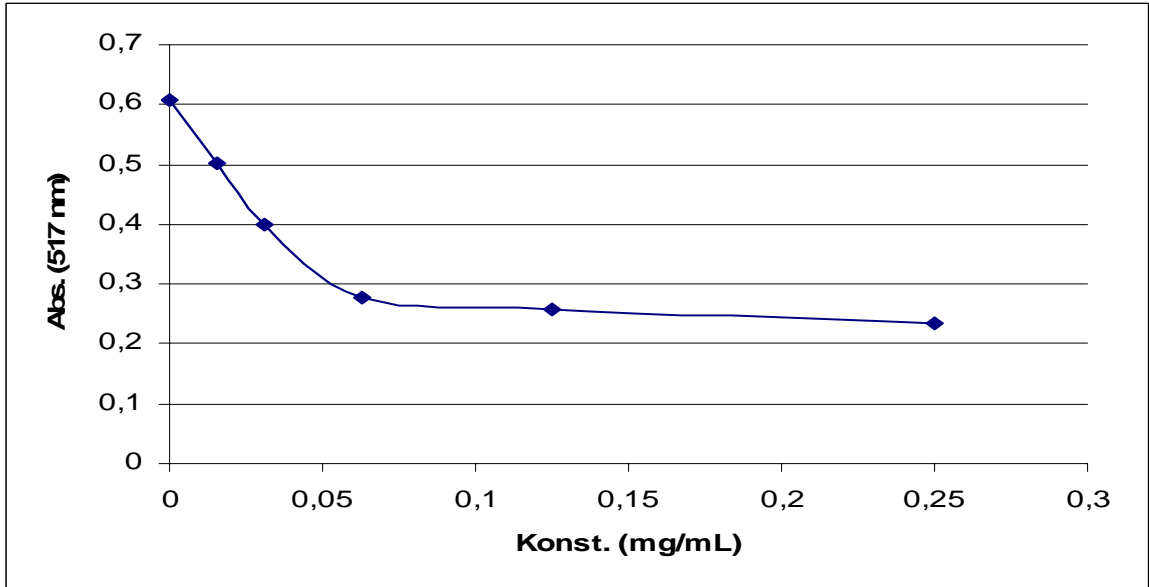
Şekil 46. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak kısmının metanol ekstraktının (110YM) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edildi ($IC_{50} = 0.0128$ mg/mL)



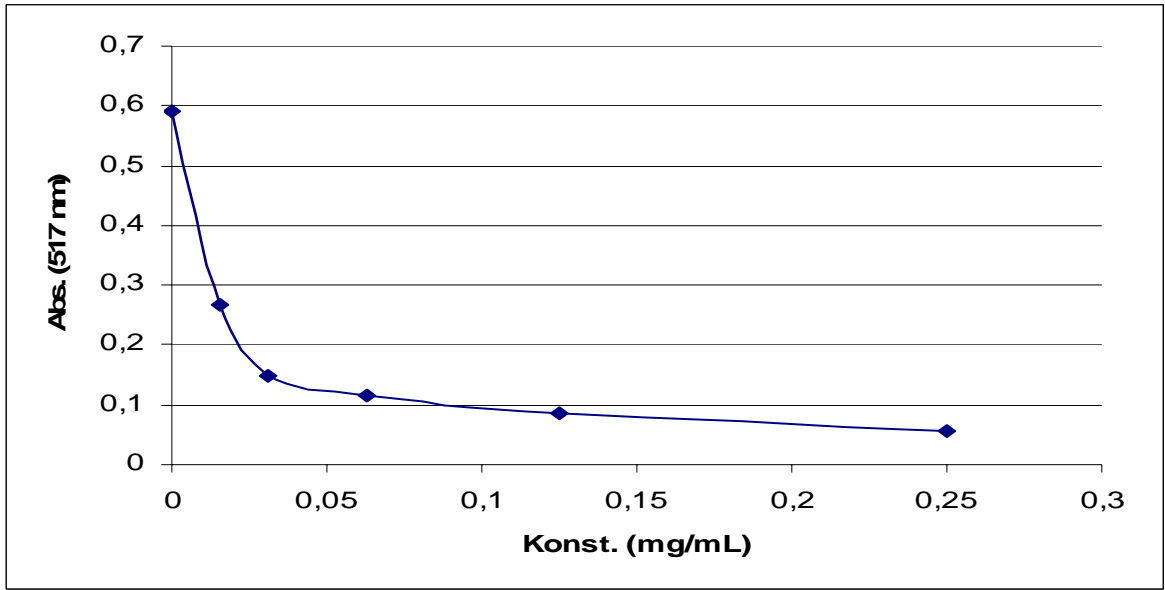
Şekil 47. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un çiçek kısmının metanol ekstraktının (110CM) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edildi ($IC_{50} = 0.0087$ mg/mL)



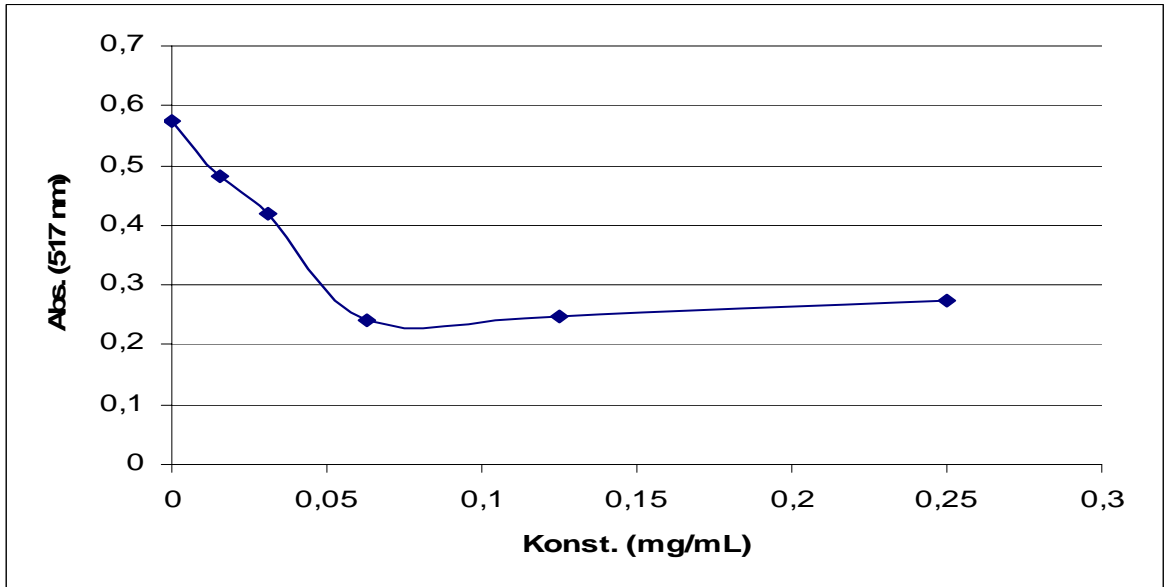
Şekil 48. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un sap kısmının metanol ekstraktının (110SM) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC₅₀) olarak ifade edildi (IC₅₀ = 0.03 mg/mL)



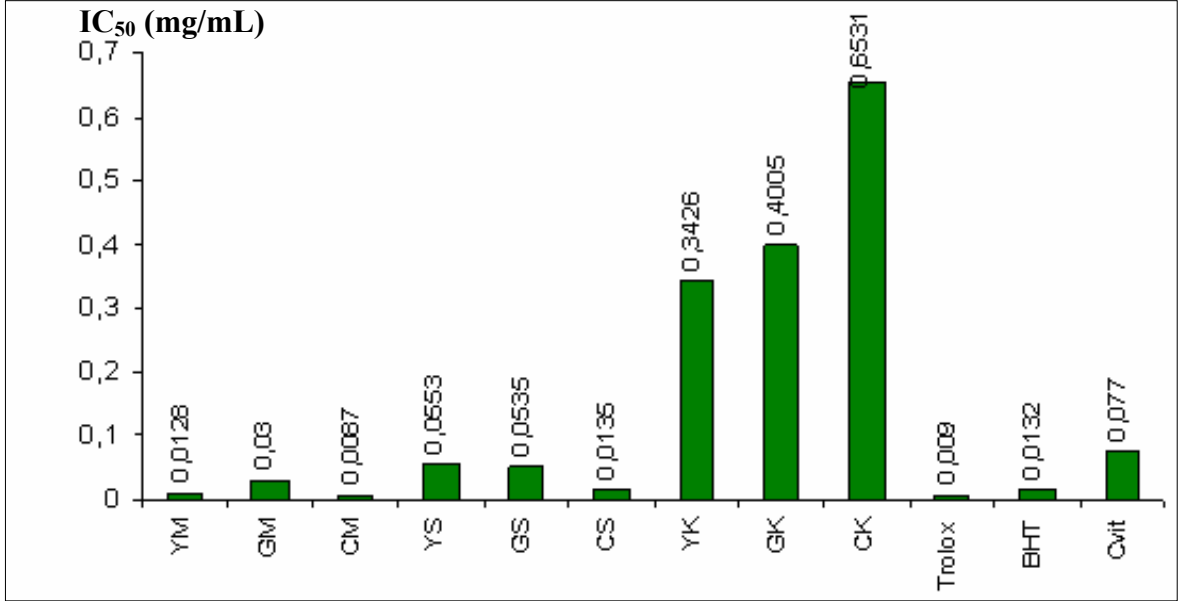
Şekil 49. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak kısmının sulu ekstraktının (110YS) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC₅₀) olarak ifade edildi (IC₅₀ = 0.0553 mg/mL)



Şekil 50. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un sap kısmının sulu ekstraktının (110CS) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edildi ($IC_{50} = 0.0135$ mg/mL)



Şekil 51. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak kısmının sulu ekstraktının (110SS) DPPH• radikali temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edildi, aktivite kontrolün absorbansını (maksimum absorbans) yarıya düşüren numune konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edildi ($IC_{50} = 0.0535$ mg/mL)



Şekil 52. *P. bistorta* ssp. *carneum*'un yaprak (Y), çiçek (C) ve sap (S) kısımlarının kloroform (K), metanol (M) ve sulu (S) ekstraktlarının DPPH• radikali temizleme aktiviteleri. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafiğe geçirilerek elde edilen IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu değerleri kullanılarak oluşturuldu

Calis vd. (1999) nin *Polygonum salicifolium*'un flavonoid glikozitleri üzerine yaptıkları bir çalışmada TLC otografik yöntemler ile DPPH• radikale karşı temizleyici etki gösterdi.

Hsu (2006) nin *Polygonum aviculare* L.'nin etanol ekstraktları üzerine yapılan serbest radikal temizleme aktivitesi ve süper oksit temizleme aktivitesi tayinlerinde pozitif sonuçlar elde edilmiş ve bitkinin antioksidan etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Peng vd. (2003) nin *Polygonum hydropiper* L.'nin yapraklarında yaptıkları çalışmada izole edilen on flavonoid bileşiği üzerine yapılan Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) tayininde güçlü antioksidatif aktivite bulunmuştur.

Mevcut çalışmada *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*'un çiçek, yaprak ve sap kısımlarının metanol ve sulu ekstraktlarında önemli derecede DPPH• radikali temizleme aktivitesi tespit edilmiştir.

3.4. Antimikrobiyal Aktiviteler

3.4.1. Agar Kuyucuk Testi

P. bistorta ssp. *carneum*'un metanol ekstraktları *C. tropicalis* mantarına karşı hafif antifungal etki göstermiştir. Sulu ekstraktları ise çalışılan bakteri ve mantarlara karşı bir etki göstermemiştir.

Tablo 9. Metanol ve sulu ekstraktların antimikrobiyal aktivite tayini sonuçları (500 µg/ml)

Numune	Mikroorganizmalar ve İnhibisyon Çapı (mm)									
	Ec	Yp	Kp	Pa	Ef	Sa	Bc	Ca	Ct	Cg
110CM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
110SM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
110YM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Metanol kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110SS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110YS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Su Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazidime	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NT	NT	NT
Triflucan	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+++	+++	+++

110CM: Çiçek-metanol; 110SM: Sap-metanol; 110YM: Yaprak-metanol; 110CS: Çiçek-sulu; 110GS: Gövde- sulu; 110YS: Yaprak- sulu
NT: Test edilmedi

Ec: *E. coli* ATCC 25922, Yp: *Y. pseudotuberculosis* ATCC 911, Kp: *K. pneumoniae* ATCC 13883, Pa: *P. aeruginosa* ATCC 10145, Ef: *E. faecalis* ATCC 29212, Sa: *S. aureus* ATCC 25923, Bc: *B. cereus* 702 Roma, *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. glabrata* ATCC 66032. Results were interpreted in terms of the diameter of the inhibition zone: (-): < 5.5 mm; (+): 5.5-10 mm; (++) : 11-15 mm, (+++): >15mm.

3.4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Testi

P. bistorta ssp. *carneum*'un kloroform ekstraktları çalışılan bakteri ve mantarlara karşı iyi etki göstermiştir. Özellikle Gram pozitif bakterilere karşı olan antibakteriyal etki yüksek olmuştur. Bitkinin özellikle gövde kısmının kloroform ekstraktı oldukça yüksek antibakteriyal etki göstermiştir. *Y. pseudotuberculosis*'e karşı olan aktivite standart olarak kullanılan Ampicillin ile aynıdır. *K. pneumoniae*'e karşı olan aktivite standart olarak

kullanılan Ampicillin`den daha yüksektir. Benzer şekilde *E. faecalis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı da standarda yakın aktivite gözlenmiştir.

Tablo 10. Kloroform ekstraktları antimikrobiyal aktivite tayini sonuçları

Numune	Mikroorganizmalar ve MIC ($\mu\text{g/mL}$) Değerleri								
	Ec	Yp	Kp	Pa	Ef	Sa	Bc	Ca	Ct
110CK*	500	32	62	125	62	62	>500	125	NT
110SK*	500	32	16	500	8	8	>500	250	NT
110YK*	125	32	62	500	32	32	>500	125	NT
Amp.	8	32	32	>128	2	2	2	NT	NT
Flu.	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	8	8

NT: Test edilmedi

*: 500 $\mu\text{g/mL}$ `ye kadar çalışıldı

#: 100 $\mu\text{g/mL}$ `ye kadar çalışıldı

110CK: Çiçek-kloroform; 110SK: Sap- kloroform; 110YK: Yaprak- kloroform;

Ec: *E. coli* ATCC 25922, Yp: *Y. pseudotuberculosis* ATCC 911, Kp: *K. pneumoniae* ATCC 13883, Pa: *P. aeruginosa* ATCC 10145, Ef: *E. faecalis* ATCC 29212, Sa: *S. aureus* ATCC 25923, Bc: *B. cereus* 702 Roma, C. *albicans* ATCC 60193, Ct: *C. Tropicalis* ATCC 13803, Amp.: Ampicillin, Flu: Fluconazole

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Polygonum bistorta ssp. *carneum*'un metanolik ekstraktlarının kimyasal bileşiminin LC-UV ile aydınlatılmasında geliştirilen yöntemde düşük konsantrasyonlarda pik alanının çözünürlüğü kabul edilebilir değerlerde bulunurken alıkonma zamanlarının mükemmel çözünürlüğü elde edildi. Ayrıca tüm 12 fenolik standart için lineer cevaplar ($R^2 > 0.999$) elde edildi (Tablo 2). Tüm standartlar için LOD değerleri 0.2 ppm'in altındadır ki bu değer bitki ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin dedeksiyonu için yeterlidir. Fenolik standartlar kullanılarak LC-DAD metodunun optimizasyonunun ardından *P. bistorta* ssp. *carneum*'un metanolik ekstraktları analiz edildi. Bu ekstraktlarından her birinden önemli derecede farklı profiller elde edildi. Flavonol türevlerinin aydınlatılmasına yönelik yapılan hidroliz sonucunda flavonol-glikozitlerce zengin olduklarına karar verilen ekstraktlar için flavonol-glikozit standartlarının ilave analiz sonuçlarına sahip olmadığımız için LC-DAD ile esas piklerin tanımlanması problemlidir. Bundan dolayı *P. bistorta* ssp. *carneum* ekstraktlarının esas fenolik bileşiklerinin yapılarını aydınlatma aracı olarak LC-MS incelendi.

Elde edilen kütle spektrumları uygun literatür verileriyle karşılaştırıldı (Tablo 3). Temsilci olarak alınan yaprak ekstraktında 13 şeker bağlı flavonol a'dan m'e (Tablo 3) gösterilmiştir. Kuersetin ve kamferol aglikonlarından ibaret olan bu flavonollar mevcut yöntemle tanımlanmıştır. Sonuçlar heksoz, pentoz, deoksiheksoz, diheksoz, deoksiheksoz+heksoz, heksoz+pentoz ve heksoz+CH₃ şeklinde sınıflandırılarak verilmiştir. Bağlı şeker gruplarında spesifik tanımlama şeker standartlarının ilave analizleri olmadığından dolayı yapılamamıştır. Çalışma gerekli görülürse bağlı şekerlerin tanımlanmasını mümkün kılan şartlarda daha ileriye götürülebilir.

P. bistorta ssp. *carneum*'un yapraklarının ekstraktında hidrolizden dolayı HPLC-DAD kromatogramlarında kaybolan pikler (Şekil 22) flavonol-glikozitler olarak tanımlandı. Fakat yine de farklı hidroliz edilmeyen ekstraktlarda pek çok ilave fenolik bileşikler LC-MS tarafından tespit edildi. Bunlardan yöntem geliştirmede kullanılan standartlar analizi mevcut olan gallik asit, protokatekuik asit, kateşin, epikateşin, rutin ve kuersetin kütle spektrometri ve standartların alıkonma zamanları ile karşılaştırarak tanımlandı (bkz Tablo 2 ve Şekil 26-31). Mevcut alıkonma zamanları ve kütle spektrumları ayrıca ilgili literatüre göre uygun bulunmuştur. RP-LC-DAD pek çok fenolik bileşikler

için güçlü bir analiz yöntemi olmasına rağmen UV dedeksiyonunun belli uygulamalar için yeterince duyarlı ve spesifik olmadığı görülmektedir. MS'in HPLC ile kombinasyonu (LC-MS) muhteşem seçici ve duyarlı teknikleri sayesinde bu dezavantajların üstesinden başarıyla gelmiştir.

Ekstraktlarda standartlar ile aydınlatılmaları uygun olan bileşiklerin yanında UV spektrumunda standartlar ile aydınlatılmaları uygun olmayan ve görülmeyen bazı ilave flavonoidler CID ile ya da CID'siz LC-MS'de ekstrakte edilmiş iyon kromatografi sayesinde tanımlanmışlardır. Bu tanımlamalar literatürde mevcut ilgili çalışmalarla karşılaştırılarak yapılmıştır.

Ekstraktların antioksidan aktivite tayinleri DPPH radikal temizleme aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Bitkinin çiçek kısmının metanolik ekstraktlarının IC₅₀ değerleri Trolox'a göre az da olsa düşük, yaprak kısmının metanolik ekstraktları BHT'den düşük ve sap kısmının metanolik ekstraktları ise C vitamininden düşük çıkmıştır. Standartlarla yapılan bu karşılaştırma bize bitkinin her bir kısmının metanolik ekstraktının oldukça yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesine sahip olduğunu gösterdi.

Metanolik ve sulu ekstraktlarda bitkinin çiçek kısmının IC₅₀ değerleri en düşük olmasına rağmen kloroform ekstraktlarında en yüksek IC₅₀ değerine sahiptir. Ayrıca kloroform ekstraktlarının IC₅₀ değerleri metanol ve sulu ekstraktlara göre karşılaştırma yapılamayacak derecede yüksek çıkmıştır.

Ekstraktların antioksidan aktiviteleri diğer antioksidan tayin yöntemleriyle de ölçülerek desteklenebilir.

P. bistorta ssp. *carneum*'un metanol ekstraktları *C. tropicalis* mantarına karşı hafif antifungal etki göstermiştir.

P. bistorta ssp. *carneum*'un sulu ekstraktları çalışılan bakteri ve mantarlara karşı bir etki göstermemiştir.

P. bistorta ssp. *carneum*'un kloroform ekstraktları çalışılan bakteri ve mantarlara karşı iyi etki göstermiştir. Özellikle Gram pozitif bakterilere karşı olan antibakteriyal etki yüksek olmuştur. Özellikle Bitkinin gövde kısmının kloroform ekstraktı oldukça yüksek antibakteriyal etki göstermiştir. *Y. pseudotuberculosis*'e karşı olan aktivite standart olarak kullanılan Ampicillin ile aynıdır. *K. pneumoniae*'e karşı olan aktivite standart olarak kullanılan Ampicillin'den daha yüksektir. Benzer şekilde *E. faecalis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı da standarda yakın aktivite gözlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

- Alonso-Salces R.M., Ndjoko K., Queiroz E.F., Ioset J.R., Hostettmann K., Berrueta L.A., Gallo B. ve Vicente F., 2004, On-Line Characterization of Apple Polyphenols by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and Ultraviolet Absorbance Detection, J. Chromatogr. A, 1046, 89-100.
- Baugh P. J., 1993, Gas Chromatography: A Practical Approach, Oxford University Press.
- Becchi M. ve Fraisse D., 1989, Fast Atom Bombardment and Fast Atom Bombardment Collision-Activated Dissociation/Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Analysis of C-Glycosidic Flavonoids, Biomed. Environ. Mass Spectrom., 18, 122-130.
- Benavides A., Montoro P., Bassarello C., Piacente S. ve Pizza C., 2006, Catechin Derivatives in *Jatropha macrantha* Stems: Characterization and LC/ESI/MS/MS Quali- Quantitative Analysis, J. Pharm. and Biomed. Anal., 40, 639-647.
- Borbalán Á.M.A., Zorro L., Guillén D.A. ve 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, J. Chromatogr. A, 1012, 31-38.
- Bovanová L. ve Brandšteterová E., 2000, Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography J. Chromatogr. A, 880, 149-168.
- Bravo M.N., Silva S., Coelho A.V., Boas L.V. ve Bronze M.R., 2006, Analysis of Phenolic Compounds in Muscatel Wines Produced in Portugal, Analytica Chim. Acta, 563, 84-92.
- Bravo, L., 1998, Polyphenol chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, Nutr. Rev., 56, 317-333.
- Calis I., Kuruüzüm A., Demirezer L.Ö., Sticher O., Ganci W. ve Ruedi P., 1999, Phenylvaleric Acid and Flavonoid Glycosides from *Polygonum salicifolium*, J Nat Prod., 62, 1101-1105.
- Cantos E., Espín J.C. ve Tomas Barberán F.A., 2002, Varietal Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC-DAD-MS-MS, J. Agric and Food Chem., 50, 5691-5696.
- Carini M., Aldini G., Furlanetto S., Stefani R. ve Facino R.M., 2001, LC Coupled to Ion-Trap MS for the Rapid Screening and Detection of Polyphenol Antioxidants from *Helichrysum stoechas*, J. Pharm. and Biomed. Anal., 24, 517-526.
- Chang L.C., Kinghorn A.D. ve C. Tringali, 2001, Bioactive Compounds from Natural Sources, Taylor & Francis, London, 159.

- Chen L. H., Boissonneault G. A. ve Glauert H. P., 1988, Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Res., 8, 739-748.
- Chilla C., Guillén D.A., Barroso C.G. ve Pérez-Bustamante J.A., 1996, Automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-diode array detection of phenolic compounds in sherry wine, J. Chromatogr. A, 750, 209-214.
- Cuendet M., Hostettmann ve Potterat O., 1997, Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helv. Chim. Akta, 80, 1144-1152.
- Cuyckens F. ve Claeys M., 2004, Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids, J. Mass Spectrom., 39, 1-15.
- Datta B.K., Datta S.K. ve Sarker S.D., 2000, Quercetin 3-*O*-(6"-galloyl)- β -D-galactoside from *Polygonum viscosum* (Polygonaceae), Biochem. Systematics and Ecology, 28, 805-807.
- Demirezer L.Ö., Branse-Passek B. ve Rauwald H.W., 2000, Flavonoids from *Polygonum bistorta* ssp. *carneum*, Hacettepe University, J. Faculty of Pharmacy, 20, 29-36.
- Dündar Y. ve Aslan R., 2000, Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar, I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Edge R., Mc Garvey D. J. ve Truscott, T. G., 1997, The carotenoids as antioxidants-a review, J. Photoch. Photobio., 41, 189-200.
- Erel O., 2004, A novel automated method to measure total antioxidant response against free radical reactions, Clin. Biochem., 37, 112-119.
- Erkoç Ş., Erkoç F. ve Keskin N., 2003, Theoretical Investigation of Quercetin and Its Radical Isomers, J. Mol. Struct. (Theochem), 631, 141-146.
- Fabre N., Rustan I. ve Hoffmann D.E., Quetin-Leclercq J., 2001, Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12, 707-715.
- Fang Z., Zhang M. ve Wang L., 2007, HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of Phenolic Compounds in Bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.), Food Chem., 100, 845-852.
- Fridovich I., 1975, Superoxide Dismutases, Annu. Rev. Biochem., 44, 147-159.
- Goldberg D.M., Tsang E., Karumanchiri A., Diamandis E.P., Soleas G. ve Ng E., 1996, Method to Assay the Concentrations of Phenolic Constituents of Biological Interest in Wines, Anal. Chem., 68, 1688-1694.
- Häkkinen S. ve Auriola S., 1998, High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Diode Array Ultraviolet Detection in the Identification of Flavonol Aglycones and Glycosides in Berries, J. Chromatogr. A, 829, 91-100.

- Halliwell B., Gutteridge J. M. ve Cross E. C., 1992, Free radical, antioxidants, and human disease: Where are we now?, J. Lab. Clin. Med., 119, 598-620.
- Heijnen C. G. M., Haenen G. R. M. M., Wiseman S. A., Tijburg L. B. M. ve Bast A. 2000, The interaction of tea flavonoids with the NO-system: Discrimination between good and bad NO, Food Chem., 70, 365-370.
- Hsu C-Y., 2006, Antioxidant Activity of Extract from *Polygonum aviculare* L., Biol. Res. 39, 281-288.
- Hwattum E. ve Ekeberg D., 2003, Study of Collision-Induced Radical Cleavage of Flavonoid Glycosides Using Negative Electrospray Ionization Tandem Quadrupole Mass Spectrometry, J. Mass Spectrom., 38, 43-49.
- Jaffé H.H. ve Orchin M., 1964, Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, John Wiley and Sons, New York.
- Kondo, H., Takahashi, M. ve Niki, E., 1997, Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants, FEBS Letters, 413, 236-238.
- Lindsay S., 1987, High Performance Liquid Chromatography (Analytical Chemistry by Open Learning), Wiley, New York.
- Cuendet M., Hostettmann K. ve Potterat O., 1997, Helv. Chim. Acta 80, 1144-1152.
- Malovaná S., García Montelongo F.J., Pérez J.P. ve Rodríguez-Delgado M.A., 2001, Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography, Anal. Chem. Acta, 428, 245-253.
- Matés J. M., Pérés-Gomez C. ve de Castro I. N., 1999, Antioxidant enzymes and human diseases, Clin. Biochem., 32, 595-603.
- Meister A. ve Anderson M. E., 1983, Glutathion, Annu. Rev. Biochem., 52, 711-60.
- Mendes E., Proença E.B., Ferraira I.M.P.L.V.O. ve Ferraira M.A., 1998, Quality Evaluation of Portuguese Honey, Carbohydr. Polym., 37, 219-223.
- Ohkawa H., Ohishi N. ve Yagi K., 1979, Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbuturic Acid Reaction, Anal. Biochem., 95, 351-358.
- Oyaizu, M., 1986, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, Jap. J. Nutr., 44, 307-315.
- Peng Z.F., Strackb D., Baumertb A., Subramaniama R., Goha N.K., Chia T.F., Tana S.N. ve Chia L.S., 2003, Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L., Phytochemistry, 62, 219-228.
- Pietta P.G., 2000, Flavonoids as Antioxidants, J. Nat. Prod., 63, 1035-1042.

- Prasain J.K., Wang C-C. ve Barnes S., 2004, Mass Spectrometric Methods for the Determination of Flavonoids in Biological Samples, Free Rad. Bio. Med., 37, 1324-1350.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. ve Paganga G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends Plant Sci., 2 , 152-159.
- Rise-Evans C. ve Packer L., 1998, Flavonoids in Health and Disease, Marcel-Dekker, New York.
- Sägesser M. ve Deinzer M., 1996, HPLC-Ion Spray –Tandem Mass Spectrometry of Flavonol Glycosides in Hops, J. Am. Soc. Brew. Chem., 54, 129-134.
- Sandra P., 2004, Advanced Separation Science, Ghent University, Belgium.
- Sies, H., 1991, Oxidative stress from basic research to clinical application, Am. J. Med., 9, 31-37.
- Silva B.A., Ferreres F., Malva J.O. ve Dias A.C.P., 2005, Phytochemical and Antioxidant Characterization of *Hypericum perforatum* Alcoholic Extracts, Food Chem., 90, 157-167.
- Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., 1998, Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing, US, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Slinkard K. ve Singleton V. L., 1977, Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult., 28, 49-55.
- Smolarz H.D., 2002, Flavonoids from *Polygonum lapathifolium* ssp. *tomentosum*, Formerly International J. Pharmacognosy, 40, 390-394.
- Smolarz H.D., Surdacka A. ve Roliński J., 2003, Influence of Ethyl Acetate Extract and Quercetin-3-methyl ether from *Polygonum amphibium* on Activation Lymphocytes from Peripheral Blood of Healthy Donor *in vitro*, Phytother. Res., 17, 744-747.
- Storz G. and Imlay J.A., 1999, Oxidative stress, Curr. Opin. Microbiol., 2, 188-194.
- Suschetet M., Siess M.-H. ve Le Bon A.-M., 1998, Canivenc Lavier, M.-C., in : INRA (Ed.), Polyphenols 96, Les Colloques, Paris, 166-204.
- URL-1, www.anzerbali.com, 2006.
- URL-2, <http://en.wikipedia.org>, 2006.
- URL-3, <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/gc.html>, 2006.
- URL-4, www.waters.com, 2006.
- URL-5, <http://hplc.chem.shu.edu>, 2006.
- URL-6, <http://www.chromatography-online.org>, 2006.

URL-7, <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>, 2006.

URL-8, <http://permaculture.info/cgi-bin/eden?plant=5062>, 2006.

US EPA, 1984, Definition and Procedure for the Method Detection Limit-Revision 1.11, 40 CFR Part 136, Appendix B, EPA.

Winston G. W. 1991, Oxidant and Antioxidants, in Aquatic Animals, Comp. Biochem. Phys., 100, 173-176.

Wollgast J. ve Anklam E., 2000, Review on Polyphenols in Theobroma cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Res. Int., 33, 423-347.

Wu Q., Wang M. ve Simon J.E., 2004, Analytical Methods to Determine Phytoestrogenic Compounds, J. Chromatogr. B, 812, 325-355.

Zywicki B., Reemtsma T. ve Jekel M., 2002, Analysis of Commercial Vegetable Tanning Agents by Reversed-Phase Liquid Chromatography- Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry and Its Application to Wastewater, J. Chromatogr. A, 970, 191-200.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Rize'de doğdu. 1995 yılında Rize Lisesi'nden mezun oldu. 1996 yılında KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdi. 2001 yılında bu bölümden Kimyager ünvanıyla mezun oldu. 2001 yılında Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü Analitik Kimya Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı, halen de bu göreve devam etmektedir. 2003 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.