

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**BİTKİSEL ÇAY BİLEŞENLERİNİN VE GIDA KATKILARININ
KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Ayça AKTAŞ KARAÇELİK

AĞUSTOS 2018

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

BİTKİSEL ÇAY BİLEŞENLERİNİN VE GIDA KATKILARININ
KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayça AKTAŞ KARAÇELİK

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“DOKTOR (KİMYA)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29.05.2018
Tezin Savunma Tarihi : 08.08.2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Trabzon 2018

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında
Ayça AKTAŞ KARAÇELİK Tarafından Hazırlanan**

**BİTKİSEL ÇAY BİLEŞENLERİNİN VE GIDA KATKILARININ
KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 24/07/2018 gün ve 1763 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

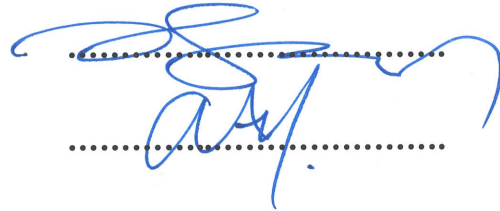
Üye : Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

Üye : Prof. Dr. Tefik ÖZEN

Üye : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR



.....



.....

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Bitkisel Çay Bileşenlerinin ve Gıda Katkılarının Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkileri” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak hazırlanmış olup TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

Lisans ve yüksek lisansda olduğu gibi doktora eğitimimde de danışmanlığımı üstlenen, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp büyük bir ilgi ve sabırla bana faydalı olmak için elinden geleni sunan ve ne zaman bir sorunla karşılaşsam benden güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen, danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Sayın Hocam Prof. Dr. Murat Küçük’e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca değerli bilgi ve tecrübeleri ile desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Şükrü Beydemir’e teşekkür ederim.

Çalışmalarımnda her türlü laboratuvar imkanlarını sağlayan KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü’ne, bölümdeki tüm hocalarıma, laboratuvar çalışmalarımnda yardımlarını ve güler yüzünü esirgemeyen Dr. Semra Alkan Türkuçar’a, SDS-PAGE çalışmalarında yardımcı olan Doktora öğrencisi Ümit Uzun’a ve laboratuvarımızın çiçeği burnunda Yüksek Lisans Öğrencisi Melek Kaya’ya teşekkür ederim.

Gıda katkı maddelerinin temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Trabzon Gıda Kontrol Laboratuvarı personeli Dr. Nagihan Yılmaz İskender’e teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu araştırma laboratuvarlarını kullanma imkanı sağlayan Sayın Doç. Dr. Hüseyin Şahin’e, laboratuvarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ersan Bektaş’a ve o güzel gönlü ile elinden geleni ardına koymayan Dr. Öğr. Üyesi Derya Efe’ye teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde üzerimde büyük emeği olan aileme tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Son olarak hayatıma girdiği andan beri beni yalnız bırakmayan ve en zor günlerimin kurtarıcısı olup beni her daim destekleyen canım eşim Ahmet Karaçelik’e ve özellikle deneysel çalışmalarımnda yalnız bırakmak zorunda kaldığım oğlum Eymen’e sonsuz sabrı için teşekkür ederim.

Ayça AKTAŞ KARAÇELİK

Trabzon 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Bitkisel ay Bileşenlerinin ve Gıda Katkılarının Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkileri” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat Küçük’n sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

08/08/2018

Ayça AKTAŞ KARAÇELİK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XVIII
SEMBOLLER DİZİNİ	XXI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Enzimler.....	3
1.3. Enzim İnhibisyonu.....	5
1.4. Karbonik Anhidraz (CA)	8
1.4.1. CA Sınıfları ve Organizmalardaki Dağılımı.....	9
1.4.2. Memelilerdeki CA İzoenzimleri	10
1.4.4. CA'ların Aktif Bölgesi ve Katalitik Mekanizması.....	12
1.4.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	13
1.4.6. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri.....	14
1.5. Fenolik Bileşikler.....	15
1.5.1. Fenolik Asitler	15
1.5.2. Flavonoidler	16
1.5.3. Stilbenler.....	19
1.5.4. Tanninler.....	20
1.5.5. Kumarinler.....	20
1.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	21
1.6.1. HPLC'nin Temel Prensipleri ve Temel Kavramlar	21
1.6.2. Yaygın Kullanılan HPLC Dedektörleri	22
1.6.2.1. UV-Görünür Bölge Dedektörü (UV/VIS)	22
1.6.2.2. Diyot Serili Dedektör (PDA)	23
1.6.2.3. Kütle Spektrometri Dedektörü (MS)	23
1.7. Çayın Genel Özellikleri ve Bitkisel Çaylar	23

1.8.	Gıda Katkı Maddeleri	28
1.9.	SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Gel Elektroforezi)	33
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	35
2.1.	Materyal.....	35
2.1.1.	Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	35
2.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	36
2.2.	Yöntem	42
2.2.1.	Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Eritrositlerden İzolasyonu	42
2.2.1.1.	Afinite Jelinin Hazırlanması	42
2.2.1.1.1.	Sepharose-4B'nin Aktifleştirilmesi	42
2.2.1.1.2.	Tirozin Takılması.....	43
2.2.1.1.3.	Sülfanilamid Kenetlenmesi.....	44
2.2.1.2.	Kan Temini ve Hemolizat Hazırlanması	45
2.2.1.3.	Kolonun Hazırlanması (Paketlenmesi) ve Hemolizatın Kolona Uygulanması	46
2.2.1.4.	Karbonik Anhidraz I Elüsyonu	47
2.2.1.5.	Karbonik Anhidraz II Elüsyonu.....	47
2.2.1.6.	Sığır Karbonik Anhidraz Elüsyonu	47
2.2.2.	Protein Tayini	48
2.2.2.1.	Yarı Kantitatif Protein Tayini	48
2.2.2.2.	Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	48
2.2.3.	Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	49
2.2.3.1.	Hidrataz Aktivitesi Tayini	49
2.2.3.2.	Esteraz Aktivitesi Tayini	50
2.2.4.	Saflaştırılan Enzim Çözeltisine Diyaliz Uygulanması	51
2.2.5.	SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü	52
2.2.5.1.	SDS- PAGE Jellerinin Hazırlanması	52
2.2.5.2.	SDS- PAGE Uygulanması.....	53
2.2.6.	Numunelerin Hazırlanması	54
2.2.6.1.	Çay Ekstraktlarının Hazırlanması.....	54
2.2.6.2.	Gıda Katkı Maddelerinin Hazırlanması.....	55
2.2.7.	Çay Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV Cihazı ile Fenolik Bileşen Analizi.....	59
2.2.7.1.	Kromatografik Analiz İçin Standartların Belirlenmesi.....	59
2.2.7.2.	Standartların ve Numunelerin Hazırlanması	61

2.2.7.3.	HPLC-DAD-UV Koşulları ve Standartların Kalibrasyonu	62
2.2.7.4.	Çay Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV Analizleri.....	63
2.2.8.	HPLC-DAD-UV Cihazı ile Kateşinler, Kafein ve Gallik Asit Analizi	63
2.2.8.1.	Kromatografik Analiz İçin Standartların Hazırlanması.....	64
2.2.8.2.	HPLC-DAD-UV Koşulları ve Standartların Kalibrasyonu	65
2.2.9.	Gıda Katkı Maddelerinin, Fenolik Bileşiklerin ve Çay Ekstraktlarının Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi.....	66
2.2.9.1.	Gıda Katkı Maddelerinin, Fenolik Bileşiklerin ve Çay Ekstraktlarının Karbonik Anhidraz Enzimi Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri	66
2.2.9.2.	Numuneler İçin % İnhibisyon, IC ₅₀ ve Ki Değerlerinin Belirlenmesi.....	67
3.	BULGULAR.....	68
3.1.	Çay Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV ile Fenolik Bileşen Analizi.....	68
3.1.1.	Fenolik Standartların HPLC-DAD-UV ile Analizi İçin Metot Geliştirme	68
3.1.2.	Fenolik Standartların Kalibrasyon Eğrileri.....	77
3.1.3.	Bitkisel Çay Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV ile Fenolik Bileşen Analizi.....	86
3.1.4.	Siyah Çay, Beyaz Çay, Yeşil Çay, Çay Lifi ve Çay Çöpü Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV ile Fenolik Bileşen Analizi	117
3.2.	HPLC-DAD-UV ile Kateşinler, Kafein ve Gallik Asit Analizi	151
3.2.1.	Kateşinler, Kafein ve Gallik Asit Standartlarının HPLC-DAD-UV ile Analizi.....	151
3.2.2.	Kateşinler, Kafein ve Gallik Asit Standartlarının Kalibrasyon Eğrileri	153
3.2.3.	Siyah Çay, Beyaz Çay, Yeşil Çay, Çay Lifi ve Çay Çöpü Ekstraktlarında HPLC-DAD-UV ile Kateşinler, Kafein ve Gallik Asitin Eş Zamanlı Analizi	156
3.3.	Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları	175
3.3.1.	Bradford Yöntemi ile Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik	175
3.3.2.	Karbonik Anhidraz Enziminin Afinitive Kromatografisi ile Saflaştırılması	175
	Sonuçları.....	175
3.3.3.	SDS-PAGE ile Karbonik Anhidrazın Saflığının Kontrolü.....	176
3.4.	Gıda Katkı Maddelerinin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkileri	178
3.4.1.	Gıda Katkı Maddelerinin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri	178

3.4.2.	Gıda Katkı Maddelerinin hCAI ve hCAII İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri.....	185
3.5.	Fenolik Bileşiklerin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkileri	199
3.5.1.	Fenolik Bileşiklerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri	199
3.6.	Çay Ekstraktlarının Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkileri	205
3.6.1.	Çay Ekstraktlarının BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri	205
3.6.2.	Çay Ekstraktlarının hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri.....	212
3.7.	Eritrosin B İçin Ki Çalışma Sonuçları	228
3.8.	Asetazolamid ve Sülfanilamid Standart İnhibitörlerin BCA Enzimi Üzerine Etkisi	229
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	232
5.	ÖNERİLER.....	239
6.	KAYNAKLAR	240
7.	EKLER	254
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

BİTKİSEL ÇAY BİLEŞENLERİNİN VE GIDA KATKILARININ KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayça AKTAŞ KARAÇELİK

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

2018, 253 Sayfa, 3 Sayfa Ek

Bu çalışmada bazı gıda katkı maddelerinin ve siyah, beyaz ve yeşil çayın yanında diğer bitkisel çay ekstraktlarının saflaştırılan sıgır karbonik anhidraz (BCA) ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCAI ve hCAII) üzerine etkileri araştırıldı. Özütlede toplam CA inhibisyonunu ölçmenin yanında numunelerdeki bileşenlerin bu inhibisyondan ne derece sorumlu oldukları % inhibisyon çalışması ile değerlendirildi. Bu bileşenlerin ve gıda katkı maddelerinin % CA inhibisyon ve IC₅₀ değerleri CA esteraz aktivitesi kullanılarak belirlendi. Bu çalışmada 3 siyah, 2 yeşil, 1 beyaz çay, 1 çay lifi ve 1 çay çöpü ekstraktlarında bileşen miktarları HPLC-DAD metodu ile belirlendi. Gallik asit siyah çaylarda en yüksek (151.2-229.2 mg/L ekstrakt), yeşil çaylarda ise en düşük (21.7-31.9 mg/L ekstrakt) olarak tespit edildi. Fermantasyon siyah çaylardaki gallik asit düzeylerini artırmaktadır. Yeşil çayda daha yüksek seviyede epigallokateşin (1953.8-3033.7 mg/L ekstrakt), epigallokateşin gallat (1424.8-2015.6 mg/L ekstrakt), epikateşin (612.6-811.5 mg/L ekstrakt) ve epikateşin gallat (612.6-811.5 mg/L ekstrakt) tespit edildi. Çay lifi ve çay çöpü ekstraktlarının bileşimi siyah çaya benzemektedir. Bitkisel çaylarda 10 fenolik bileşiğin varlığı tespit edildi. Bunlardan protokatekuik asit en sık görülen bileşiktir. Gıda katkı maddelerinin CA inhibisyonu IC₅₀ değerleri 5-5998 µM aralığında tespit edildi. En yüksek inhibisyon gösteren Eritrosin B'nin Ki değeri 0.0028 mM olarak bulundu. Fenolik asitlerin IC₅₀ değerleri 53-1940 µM arasındadır. Bitkisel çaylarda ise 0.005-1.037 mg/mL aralığında IC₅₀ değerleri görüldü. Doğal, toksik yan etkisi düşük, biyoyumlu ve suda çözünebilen CA inhibitörlerinin keşfedilmesi ilaç etken maddesi araştırmaları için önemli bulgular ortaya çıkaracaktır. Ayrıca CA'yı inhibe eden bileşenleri içeren gıdaların tüketilmesinde ortaya çıkabilecek fayda ve zararların CA inhibisyonu üzerinden değerlendirilmesi yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: karbonik anhidraz inhibisyonu, gıda katkı maddeleri, çay, fenolik bileşen, HPLC-DAD

PhD. Thesis

SUMMARY

EFFECT OF CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY OF THE HERBAL TEA COMPONENTS AND FOOD ADDITIVES

Ayça AKTAŞ KARAÇELİK

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2018, 253 Pages, 3 Pages Appendix

The effect of food additives, black, green and white teas, and herbal teas on carbonic anhydrases enzymes purified from bovine (BCA) and human (hCAI and hCAII) erythrocytes were investigated. Total CA inhibition was measured in extracts, and %inhibitions were evaluated to explore the role of components. %CA inhibition and IC₅₀ values of the components and food additives were determined by measuring CA esterase activity. The components quantities in 3 black, 2 green and 1 white tea, 1 tea fibre and 1 tea waste samples were determined by HPLC-DAD method. Gallic acid was found at highest quantities in black teas (151.2-229.2 mg/L extract) and lowest in greaan teas (21.7-31.9 mg/L extract). Fermentation increases gallic acid levels in black teas. Greean teas showed higher amounts of epigallocatechin (1953.8-3033.7 mg/L extract), epigallocatechin gallate (1424.8-2015.6 mg/L extract), epicatechin (612.6-811.5 mg/L extract), and epicatechin gallate (612.6-811.5 mg/L extract). The compositions of tea fibre and tea waste resemble that of black tea. The existence of 10 phenolics in herbal teas was shown. Protocatechuic acid was seen most frequently. IC₅₀ values of food additives for CA inhibition were 5-5998 µM. The K_i value of Erythrosine B showing a highest inhibition was found as 0.0028 mM. IC₅₀ values of phenolic acids for CA inhibition were 53-1940 µM. Herbal teas IC₅₀ values were 0.005-1.037 mg/mL. Discovering natural, nontoxic, biocompatible and water soluble CA inhibitors will explore important findings in drug leads search. In addition, potential advantages and disadvantages of consuming food CA inhibitory components should be evaluated based on CA inhibiton.

Key Words: carbonic anhydrase inhibition, food additives, tea, phenolic compound, HPLC-DAD.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.	CA enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonu kataliz mekanizmasının şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.	Benzoik asit türevleri.....	15
Şekil 4.	Sinamik asit türevi	16
Şekil 5.	Flavan yapısı.....	16
Şekil 6.	Flavon yapısı.....	17
Şekil 7.	Flavonoller.....	17
Şekil 8.	Flavanoller	17
Şekil 9.	Flavonlar	18
Şekil 10.	Flavanonlar	18
Şekil 11.	İzoflavonlar.....	18
Şekil 12.	Antosiyanidinler	19
Şekil 13.	trans-Stilbenler.....	19
Şekil 14.	cis-Stilbenler.....	20
Şekil 15.	Tanninler.....	20
Şekil 16.	Kumarinin kimyasal yapısı	21
Şekil 17.	Çay ürünlerinin dört farklı tipte (a: siyah çay, b: yeşil çay, c: beyaz çay, d: oolong çayı) fotoğrafları	23
Şekil 18.	Çayda bulunan temel kateşinler ve kafeinin yapısı	25
Şekil 19.	Çalışmada kullanılan bitkisel çayların fotoğrafları (a: adaçayı, b: ihlamur, c: kuşburnu, d: ekinezya, e: tarçın, f: papatya, g: karanfil, h: nane)	27
Şekil 20.	Sepharose-4B Jelinin Aktifleştirilmesi.....	43
Şekil 21.	Aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması	44
Şekil 22.	Sepharose-4B-L-tirozin'e diazolama aracılığıyla sülfanilamidin kenetlenmesi reaksiyonları	45
Şekil 23.	<i>p</i> -nitrofenilasetatın hidroliz reaksiyonu.....	50
Şekil 24.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 280 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı A: (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11.	

	siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit), B: a: epikateşin, b: rozmarinik asit.....	69
Şekil 25.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 240 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit).....	70
Şekil 26.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 254 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit).....	70
Şekil 27.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 260 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit).....	71
Şekil 28.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 274 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit).....	71
Şekil 29.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 280 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit).....	72
Şekil 30.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 308 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit).....	72
Şekil 31.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 324 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit).....	73
Şekil 32.	Standart fenolik bileşiklerin 500 µM'lık karışımının 348 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3.	

	protokatekualdehit, 4. <i>p</i> -OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. <i>p</i> -kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit).....	73
Şekil 33.	Analizlerde kullanılan 15 fenolik standardın DAD-spektrumları	75
Şekil 34.	Gallik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (274 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	78
Şekil 35.	Protokatekuik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (260 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri.....	79
Şekil 36.	Protokatekualdehitin 280 nm ($\lambda_{maks.}$)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	79
Şekil 37.	<i>p</i> -OH benzoik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (260 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri.....	80
Şekil 38.	Kateşinin 280 nm ($\lambda_{maks.}$)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	80
Şekil 39.	Klorojenik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (324 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri.....	81
Şekil 40.	Vanilik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (260 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	81
Şekil 41.	Kafeik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (324 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	82
Şekil 42.	Siringik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (274 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	82
Şekil 43.	Vanilinin 280 nm ($\lambda_{maks.}$)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	83
Şekil 44.	Siringaldehitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (308 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	83
Şekil 45.	<i>p</i> -Kumarik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (308 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri.....	84
Şekil 46.	Ferulik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (324 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	84
Şekil 47.	Sinapik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (324 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	85
Şekil 48.	Benzoik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (240 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	85
Şekil 49.	Ihlamur (IHS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	86
Şekil 50.	Tarçın (TAS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	92
Şekil 51.	Adaçayı (ADS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı	95
Şekil 52.	Kuşburnu (KUS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı	98
Şekil 53.	Ekinezya (EKS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı	100

Şekil 54.	Papatya (PAS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	103
Şekil 55.	Karanfil (KAS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı	107
Şekil 56.	Nane (NAS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı	111
Şekil 57.	2. Nevi Siyah Çay (NÇS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	118
Şekil 58.	Altınbaş Klasik Siyah Çay (ALS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	122
Şekil 59.	Organik Hemşin Siyah Çay (OHS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	125
Şekil 60.	Antik Yeşil Çay (AYS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	129
Şekil 61.	Organik Zümrüt Yeşil Çay (OYS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	134
Şekil 62.	Beyaz Çay (BÇS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı.....	138
Şekil 63.	Çay Lifi (ÇLS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı	142
Şekil 64.	Çay Çöpü (ÇÇS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı	146
Şekil 65.	7 standart bileşen karışımının 278 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. (-)-epigallokateşin, 3. (+)-kateşin, 4. kafein, 5. (-)-epigallokateşin gallat, 6. (-)-epikateşin, 7. (-)-epikateşin gallat).....	151
Şekil 66.	Analizlerde kullanılan 7 standart bileşenin (karışım C) spektrumları	153
Şekil 67.	Gallik asitin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	154
Şekil 68.	(-)-Epigallokateşinin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	154
Şekil 69.	(+)-Kateşinin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	155
Şekil 70.	Kafeinin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	155
Şekil 71.	(-)-Epigallokateşin gallat DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	155
Şekil 72.	(-)-Epikateşinin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	156
Şekil 73.	(-)-Epikateşin gallat DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri	156
Şekil 74.	2. Nevi Siyah Çay (NÇS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı.....	157
Şekil 75.	Altınbaş Klasik Siyah Çay (ALS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı.....	160
Şekil 76.	Organik Hemşin Siyah Çay (OHS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı.....	162

Şekil 77.	Antik Yeşil Çay (AYS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı.....	164
Şekil 78.	Organik Zümrüt Yeşil Çay (OYS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı.....	166
Şekil 79.	Beyaz Çay (BÇS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı.....	168
Şekil 80.	Çay Lifi (ÇLS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı.....	170
Şekil 81.	Çay Çöpü (ÇÇS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı.....	172
Şekil 82.	Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.....	175
Şekil 83.	Saflaştırılan BCA enziminin CA hidrataz aktivitesi ve protein tayin grafiği.....	176
Şekil 84.	Saflaştırılan hCAI ve hCAII izoenzimlerin CA hidrataz aktivitesi ve protein tayin grafiği.....	176
Şekil 85.	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA) ve insan karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCAI ve hCAII) SDS-PAGE görüntüsü.....	177
Şekil 86.	Protein standartlarının Rf değeri ile molekül ağırlıklarının logaritması alınarak çizilen standart grafik.....	177
Şekil 87.	BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çalışılan 20 farklı gıda katkı maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri.....	179
Şekil 88.	BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin IC ₅₀ (µM) değerleri.....	184
Şekil 89.	BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin 2 mg/ml (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	184
Şekil 90.	hCAI enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan 20 farklı gıda katkı maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri.....	186
Şekil 91.	hCAI esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin IC ₅₀ (µM) değerleri.....	191
Şekil 92.	hCAI esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	191
Şekil 93.	hCAII enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan 20 farklı gıda katkı maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri.....	193
Şekil 94.	hCAII esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin IC ₅₀ (µM) değerleri.....	198
Şekil 95.	hCAII esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	198

Şekil 96.	BCA enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan 14 farklı fenolik standardın IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri	200
Şekil 97.	BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 14 fenolik bileşiğin IC ₅₀ (µM) değerleri.....	204
Şekil 98.	BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 14 fenolik bileşiğin 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	204
Şekil 99.	BCA enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri	206
Şekil 100.	BCA esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC ₅₀ (mg/mL) değerleri	208
Şekil 101.	BCA esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	208
Şekil 102.	BCA enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri	209
Şekil 103.	BCA esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC ₅₀ (mg/mL) değerleri.....	211
Şekil 104.	BCA esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	211
Şekil 105.	hCAI enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri	213
Şekil 106.	hCAI esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC ₅₀ (mg/mL) değerleri	215
Şekil 107.	hCAI esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	215
Şekil 108.	hCAI enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri	216
Şekil 109.	hCAI esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC ₅₀ (mg/mL) değerleri	218
Şekil 110.	hCAI esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	218
Şekil 111.	hCAII enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri.....	220
Şekil 112.	hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC ₅₀ (mg/mL) değerleri	222

Şekil 113. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri	222
Şekil 114. hCAII enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC ₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri	223
Şekil 115. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC ₅₀ (mg/mL) değerleri	225
Şekil 116. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri.....	225
Şekil 117. hCAI izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Eritrosin B konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	228
Şekil 118. BCA enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan asetazolamidin IC ₅₀ değerinin bulunması için 6 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri	229
Şekil 119. BCA enziminin hidrataz aktivite üzerine çalışılan asetazolamidin IC ₅₀ değerinin bulunması için 6 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri	230
Şekil 120. BCA enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan sülfanilamidin IC ₅₀ değerinin bulunması için 6 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri	230
Şekil 121. BCA enziminin hidrataz aktivite üzerine çalışılan sülfanilamidin IC ₅₀ değerinin bulunması için 6 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri	231

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	12
Tablo 2. Çalışmada kullanılan gıda katkı maddeleri ve kullanım şekilleri.....	32
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar, aletler, malzemeler ve markaları.....	35
Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar	36
Tablo 5. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	37
Tablo 6. Esteraz aktivite tayini için pipetleme prosedürü.....	51
Tablo 7. % 5 ve % 10'luk SDS-PAGE hazırlanışında kullanılan madde miktarları.....	53
Tablo 8. Çay ekstraktlarının kodları	55
Tablo 9. Çalışmada kullanılan gıda katkı maddelerinin E kodları, molekül şekilleri ve molekül ağırlıkları.....	56
Tablo 10. HPLC analizinde kullanılan fenolik standartların yapısı.....	60
Tablo 11. Standartların ve çay ekstraktlarındaki fenolik bileşenlerin ayrılmasında kullanılan hareketli faz gradient programı.....	62
Tablo 12. Kullanılan kateşinler, kafein ve gallik asit standartlarının hazırlanması.....	64
Tablo 13. Standart karışım çözeltilerin hazırlanması A, B ve C.....	65
Tablo 14. Kateşinler, kafein ve gallik asit standartların ayrılmasında kullanılan hareketli faz gradient programı.....	65
Tablo 15. Gıda katkı maddelerinin, fenolik bileşiklerin ve çay ekstraktlarının karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan pipetleme prosedürü	67
Tablo 16. HPLC'de yürütölen 15 fenolik standardın UV-280 nm'deki tutulma zamanları.....	68
Tablo 17. İhlamur ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	88
Tablo 18. Tarçın ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	93
Tablo 19. Adaçayı ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	96
Tablo 20. Kuşburnu ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	99
Tablo 21. Ekinezya ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	101

Tablo 22.	Papatya ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	104
Tablo 23.	Karanfil ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	108
Tablo 24.	Nane ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	112
Tablo 25.	HPLC-DAD ile bitkisel çay ekstraktları fenolik bileşen miktarları	115
Tablo 26.	2. Nevi Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	118
Tablo 27.	Altınbaş Klasik Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	122
Tablo 28.	Organik Hemşin Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	126
Tablo 29.	Antik Yeşil Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	130
Tablo 30.	Organik Zümrüt Yeşil Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	134
Tablo 31.	Beyaz Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	139
Tablo 32.	Çay Lifi ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	143
Tablo 33.	Çay Çöpü ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	148
Tablo 34.	HPLC'de yürütülen 7 standart bileşen karışımının DAD-278 nm'deki tutulma zamanları	152
Tablo 35.	2. Nevi Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	158
Tablo 36.	Altınbaş Klasik Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	160
Tablo 37.	Organik Hemşin Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	162
Tablo 38.	Antik Yeşil Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	164
Tablo 39.	Organik Zümrüt Yeşil Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	166
Tablo 40.	Beyaz Çay ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	168
Tablo 41.	Çay Lifi ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	170
Tablo 42.	Çay Çöpü ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları	172

Tablo 43.	HPLC-DAD ile siyah çay, beyaz çay, yeşil çay, çay lifi ve çay çöpi ekstraktlarındaki kateşinler, kafein ve gallik asit miktarları.....	174
Tablo 44.	BCA, hCAI ve hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan gıda katkılarının IC50 (μ M) değerleri	226
Tablo 45.	BCA, hCAI ve hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çayların IC50 (mg/mL) değerleri.....	227
Tablo 46.	BCA, hCAI ve hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan <i>C. sinensis</i> çayların IC50 (mg/mL) değerleri.....	227
Tablo 47.	hCAI izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Eritrosin B'nin Ki değeri ve inhibisyon türü.....	228
Tablo 48.	Gıda katkı maddelerinin izoenzimler açısından seçicilik faktörleri (Sf).....	237
Tablo 49.	Bitkisel çay ekstraktlarının izoenzimler açısından seçicilik faktörleri (Sf).....	238
Tablo 50.	<i>C. sinensis</i> çay ekstraktlarının izoenzimler açısından seçicilik faktörleri (Sf).....	238

SEMBOLLER DİZİNİ

ACD	Asit-Sitrat-Dekstroz
BCA	Sığır Karbonik Anhidraz
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
BSA	Sığır Serum Albümin
C	(+)-Kateşin
C ₁₈	Oktadesil
CA	Karbonik Anhidraz
Çay Ekstraktları	Bitkisel Çay, Siyah Çay, Beyaz Çay, Yeşil Çay, Çay Atığı ve Çay Lifi
DAD	Çoklu Diyot Serili Dedektör (diode array dedector)
EC	(-)-Epikateşin
ECG	(-)-Epikateşin gallat
EGC	(-)-Epigallokateşin
EGCG	(-)-Epigallokateşin gallat
EU	Enzim Ünitesi
hCAI	İnsan Karbonik Anhidraz-I izoenzimi
hCAII	İnsan Karbonik Anhidraz-II izoenzimi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-UV	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
pH	Hidrojenin gücü
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per minute)
RT	Alıkonma Zamanı (Retention time)
Tris	Trihidroksimetil amino metan
V _{maks}	Maksimum hız
α	Alfa

β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ζ	Zeta
η	Eta



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler doğal olarak canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki reaksiyonları hızlandıran çoğunluğu protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bazı bileşikler tarafından enzimlerin aktivitelerinin azaltılması hatta durdurulması olayına “inhibisyon” ve buna sebep olan bileşiklere de “inhibitör” denir. İnhibitörler genellikle küçük molar kütleyle sahip bileşikler veya iyonlardır. Biyolojik sistemlerde enzimatik aktivitenin inhibe edilmesi başlı başına bir kontrol mekanizması olup birçok ilaç ve zehirli bileşik de etkisini bu yolla göstermektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidrolizaz, E. C. 4. 2. 1. 1) eritrositleri de içine alan pek çok hücre tipinde pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilen ve aktif bölgesinde çinko (Zn^{+2}) iyonu içeren bir metaloenzimdir (Supuran vd. , 2003). Canlılarda karbondioksitin bikarbonata ve hidrojen iyonuna dönüşümünü tersinir olarak katalizler. Memelilerde farklı doku dağılımı gösteren karbonik anhidrazın 16 farklı (CAI-XIV) izoenzimi tanımlanmıştır (Supuran, 2010). CAI hücre içinde sitozolde yer alan ve eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan protein olup ayrıca kornea ve kalın bağırsağın epitelyumunda, lenste, ter bezlerinde ve adipoz dokuda bulunur. CAII izoenzimi diğer izoenzimlere göre katalitik aktivitesi oldukça yüksek olup özellikle göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda yaygın olarak bulunmaktadır. Göz retinasında bulunan CAII izoenzimi göz içi basıncı oluşumunun başlıca sorumlusudur ve glokom hastalığında yüksek göz içi basıncını düşürmenin en etkili yolu CAII aktivitesini inhibe etmektir (Renzi vd., 2000).

Karbonik anhidraz enzimi aktivitesinin birçok kimyasal madde ve ilaçlar tarafından inhibisyon ve aktivasyon etkileri bilim adamları tarafından araştırılmış ve literatürde rapor edilmiştir (Supuran ve Scozzafava, 2001; Beydemir ve Gülçin, 2004). Bu enzim birçok dokuda ilaçlar için hedef molekül olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla başta asetazolamid olmak üzere heteroaromatik sülfonamidler karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörleri olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu inhibitörler, başta glokom tedavisinde ilaç, anti-kanser, antitümör, anti-obezite, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda

ilaç, ağrı kesici, pozitron emisyon tomografisi ve manyetik rezonans görüntülenmesinde, diagnostikte his materyali, antiülser, diuretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak halen kullanılmaktadır (Bülbül vd, 2003). Bu yüzden son yıllarda CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni inhibitör bileşiklerin keşfedilmesi araştırmacılar için çok büyük önem kazanmıştır (Supuran, 2008). Belirlenecek olan doğal ya da sentetik olan yeni CA inhibitörleri ilaç potansiyeli olan bileşenlerin keşfinde önemli olacaktır.

Modern gıda teknolojisinde işlenmiş gıdaların üretiminin artmasıyla birlikte gıda katkı maddelerinin kullanımı da hız kazanmıştır. Gıda katkı maddeleri; yiyeceklerin hazırlanması sırasında besinlerin bozulmasını önlemek, tadını, yapısını ya da besin değerini artırmak, renk, görünüş, lezzet gibi duyuşsal özelliklerini düzeltmek amacıyla besinlere eklenen maddelerdir. Gıda katkı maddelerinin insandaki enzimler üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar kısmen mevcut olup, karbonik anhidraz (CA) ile ilgili çalışmalar literatürde çok fazla yer almamaktadır (Esmaili vd., 2016; Sonmez vd., 2014). CA tüm vücutta yaygın olarak bulunan ve fizyolojik öneme sahip bir enzimdir. Bu enzimin inhibisyonunda ve aktivasyonunda meydana gelen değişiklikler hem hücreleri hem de organizmayı etkilemektedir.

Camellia sinensis L. bitkisinin yaprak ve tomurcuklarından elde edilen çay dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecektir. Çay kateşinleri ve onların türevlerini içeren zengin polifenol kaynağı sayesinde çay alımı ile kanser görülme sıklığı, obezite, tip 2 diyabet riski, kardiyovasküler hastalık arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Vinson vd., 2004; Stodt ve Engelhardt, 2013). Bu nedenle çaylar antienflamatuar, antioksidan, antikarsinojenik ve antimutagenik etkilere sahiptir.

Bu çalışmada amaç, gıda katkı maddelerinin ve siyah, beyaz ve yeşil çayın yanında diğer bitkisel çaylardan elde edilen ekstraktların satın alınan ve afinite kolon kromatografisi ile saflaştırılmış olan sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA) ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCAI ve hCAII) üzerine etkilerini incelemektir. Özütlelerde toplam CA inhibisyonunu ölçmenin yanı sıra numunelerdeki bileşenlerin bu inhibisyondan ne derece sorumlu olduklarını belirlemek amacıyla % CA inhibisyon çalışması yapılmıştır. Bitki fenoliklerinin ve gıda katkı maddelerinin % CA inhibisyon ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Tüm numunelerde karbonik anhidraz aktivitesi, esteraz aktivitesi uygulanarak belirlenmiştir.

Böylece inhibitor olarak belirlenen doğal bileşiklerin başta glokom olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde kullanılacak ilaçların tasarımı ve farmokolojik uygulamaları için

önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Aynı zamanda çalışmada elde edilen bulgular CA'yı ileri derecede inhibe eden bileşenleri içeren gıdaların tüketilmesinde ortaya çıkabilecek fayda ve zararların CA inhibisyonu üzerinden de değerlendirilmesini sağlayacaktır.

Doğal, toksik yan etkisi düşük ya da olmayan, biyouyumlu ve suda çözünebilen CA inhibitörlerinin keşfedilmesi çeşitli hastalıklarda kullanılan ilaç etken maddesi için önemli bulgular ortaya çıkaracaktır.

1.2. Enzimler

Enzimler, büyük bir bölümü protein yapısında olan ve canlı organizmalardaki bütün kimyasal reaksiyonları katalizleyen biyomakromoleküllerdir. Enzimler sayesinde biyokimyasal reaksiyonlar saniyenin binde biri kadar süre içinde, hiçbir yan ürün oluşmadan % 100'lük bir ürün verimi ile gerçekleşir. Bir grup katalitik RNA molekülleri (ribozimler) hariç bütün enzimler protein yapısındadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Turnover sayısı (enzimlerin katalizleme güçleri), birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına eşittir. Karbonik anhidraz (CA), enzimler arasında en yüksek turnover sayısına sahip olanıdır (600.000 s^{-1}). Yani bir karbonik anhidraz molekülü tarafından reaksiyonu $1/600.000$ saniyede, yani 1.7 mikrosaniyede gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Diğer proteinler gibi enzimler de yaklaşık olarak 12.000'den 1 milyona kadar değişen molekül kütesine sahiptirler. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara ihtiyaç duymazlar. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Se gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metalorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimler aktivite gösterebilmeleri için hem koenzime hem de bir veya daha fazla metal iyonuna ihtiyacı vardır. Bir koenzim veya metal iyonu protein yapısına çok sıkı hatta kovalent olarak bağlanıyorsa buna prostetik grup denir. Metal iyonları veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılırken bu gibi enzimlerin sadece protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılmaktadır. Koenzimler, tiamin pirofosfat; aldehytler, koenzim A; açıl grupları gibi özgül işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak görev yaparlar. Koenzimler çoğunlukla diyet ile düşük

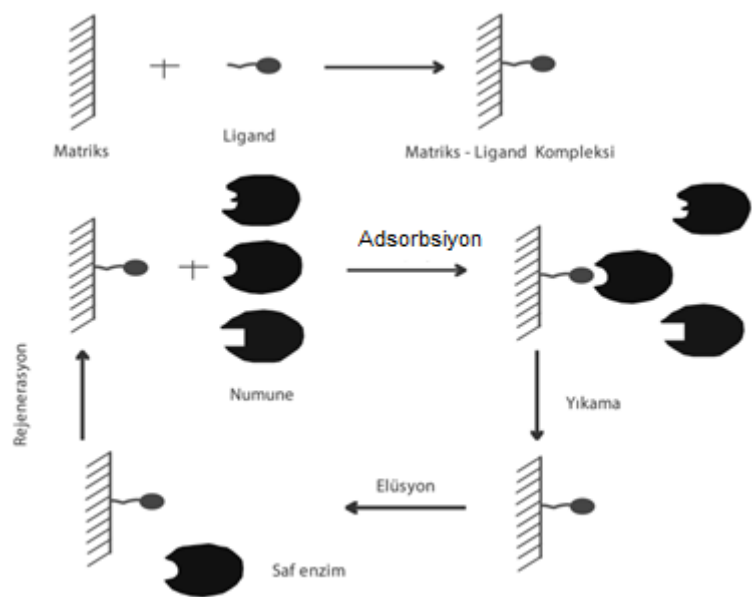
miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından, katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre altı ana sınıfa ayrılıp alt gruplarla fonksiyonları tam olarak tanımlanır. Her enzim bir sistematik kod numarasına sahiptir. Bu numara E.C. (Enzyme Commission) harflerinden sonra ardı ardına gelen dört rakamdan oluşur. Birinci rakam, bu enzimin hangi sınıfa ait olduğunu belirtir ikinci ve üçüncü rakamlar genellikle substrat(lar) üzerinde ne türden değişimlere sebep olduğunu veya hangi türden bir substratı kullandığını ifade eder. Dördüncü rakam, enzimin bu listeye ilave edilme sırasını gösterir ki bu rakam bu sınıftan yeni enzimler tanımlandıkça artmaktadır. Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon özgülüğüne sahip enzimleri içerir. Oksidoredüktazlar (1. sınıf), redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Transferazlar (2. sınıf), iki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Hidrolazlar (3. sınıf), su katılması ile bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Liyazlar (4. sınıf), oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir. İzomerazlar (5. sınıf), molekül içindeki yer değişikliklerini katalizleyen enzimlerdir. Ligazlar (6. sınıf), enerjice zengin bir bağın kopması sonucu açığa çıkan enerjiyi kullanarak iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Her hücre tipi binlerce değişik protein içermektedir ve her organizma kendisine özgü proteinlere sahiptir. Buna ek olarak her bir protein biyolojik aktivitesini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu yüzden bir proteinin saf halde bir hücreden ya da dokudan izolasyonu (saflaştırılması) oldukça güç bir iştir. Bu güçlüklerle rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim literatürde tanımlanmış, hatta birçoğu saf olarak elde edilip kinetik açıdan incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein çeşitli kaynaklardan yüksek saflık derecesinde izole edilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar tesbit edilmemiş birçok enzim varlığını göstermektedir. Proteinler üç boyutlu yapıları, sıcaklık, pH, yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilenerek kısa sürede enzim aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim izolasyonu deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır. Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin; molekül büyüklükleri, çözünürlük farklılıkları, elektriksel yükleri,

adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıkları ve diğer moleküllere karşı biyolojik afiniteleri esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Afinite kromatografisi, spesifik ligand esasına dayanan ilgili bir proteini saflaştırmak için kullanılan yöntemlerden biridir. Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olan afinite kromatografisi ile saflaştırılmak istenen hedef biyomolekülün, kolon maddesi (matriks) üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş ve hedef molekülü tamamlayıcı bağlanma uçları içeren ligandına spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir (Şekil 1). Matriks olarak Sephadex, Biogel, Sepharose gibi farklı jeller kullanılabilir. Saflaştırılacak madde için matrikse bağlanan ligandın spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Enzim inhibitörleri gibi küçük ligandların doğrudan matrikse bağlanması ile hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasındaki sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu gibi durumlarda çözüm, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için uygun uzantı kollarını matriksle ligand arasına sokmaktır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).



Şekil 1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

1.3. Enzim İnhibisyonu

Proteinlerin önemli bir sınıfını oluşturan enzimler peptit zincirleri halinde temel yapı elemanları aminoasitlerden oluşur ve kendilerine özel üç boyutlu yapıya sahiptir. Bu

yapıları üzerinde substrat denilen molekülleri bağlayabilen ve katalitik etki gösterebilen bölgeleri vardır. Enzimler katalitik işlemleri, substratları uygun bir oryantasyonda bir araya getirip böylece birbirleri ile reaksiyon verme şanslarını artırarak gerçekleştirir.

Hücrelerde bulunan enzimlerin aktiviteleri daha etkin çalışabilmeleri için çok çeşitli yollarla ayarlanabilir. Substratlar dışında birçok sayıda madde, enzime substratın bağlanmasını etkileyecek bir yolla bağlanarak enzim aktivitesini değiştirebilir. Bu bağlanmanın sonucu olarak enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitesi oldukça yavaşlar ya da tamamen durursa bu türden maddelere inhibitör adı verilir. Enzim aktivitesinin inhibitörlerin etkisiyle azalmasına da inhibisyon denir. İnhibitörler genellikle küçük molar kütleyle sahip bileşikler veya iyonlardır. Bazı enzim inhibitörleri hücre içinde mevcut olup bu moleküllerin fonksiyonu enzim aktivitesini düzenlemek ya da ayarlamaktır. Diğer birçok madde ise organizmaya yabancı olup bu inhibitörler ya sentetik ilaçlar ya da toksiteye sahip maddeler şeklinde bilinir. Biyolojik sistemlerde enzimatik aktivitenin inhibe edilmesi başlı başına bir kontrol mekanizması olup birçok ilaç ve zehirli bileşik de etkisini bu yolla göstermektedir. Aynı zamanda inhibisyon olayından, enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır.

Enzimlerin inhibisyonu, dönüşümsüz ve dönüşümlü olmak üzere başlıca iki şekilde gerçekleşebilir. Bu etkileri gösteren inhibitörler ya dönüşümsüz inhibitör ya da dönüşümlü inhibitör olarak adlandırılır ve bu etkileşimler sonucunda enzim aktivitesi ya kalıcı ya da geçici olarak engellenmiş olur.

Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız olan V_{maks} azalır, enzimin substrata ilgisini gösteren sabit olan K_M değişmeden kalır. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir role sahip olan asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu uğraması buna bir örnektir.

Dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör arasında bir denge reaksiyonu söz konusudur. Bu inhibisyon üç grupta incelenir. Bunlar: yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur.

Yarışmalı inhibisyon, dönüşümlü inhibisyonun en basit tipidir. Yarışmalı inhibitör yapısal olarak substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını engellemiş olur. Bu inhibisyon etkisi, substrat konsantrasyonunu artırmakla ortadan kaldırılabılır. Yani enzimin V_{maks} değeri değişmezken, K_m değeri artar.

Yarışmasız inhibisyonda ise inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu, bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini, enzimin katalitik aktivitesi denilen turnover sayısını düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma olayı gerçekleşmez. Ayrıca substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyonda ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{maks} değeri azalırken, K_m sabit kalır. Substrat ve inhibitör tamamen farklı bölgelere bağlandığı için enzimin iki çeşit inaktif kompleksi oluşur.

Bir başka dönüşümlü inhibisyon çeşidi olan yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör serbest enzime değil, sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. Enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi ortamda sürekli varolacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında V_{maks} azalır. ESI kompleksinin oluşumu ile S kompleksi ortamdan sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksi uzaklaştığı için K_m küçülür. Yarı yarışmalı inhibisyon bir substratlı reaksiyonlarda ender görülür, buna karşılık iki substratlı reaksiyonlarda yaygındır.

Lineer karışık tip inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunun özel bir çeşidi olup dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda enzim (E), substrat (S) ve inhibitörün (I) bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır.

Bir multienzim sisteminin kinetiği tek bir enziminkinden daha karmaşık olup, net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kabiliyetine sahiptir. Bu sistemlerin genelinde seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiği zaman metabolik yolun ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere “allosterik enzimler” denir ve feed-back inhibisyonu bir çeşit allosterik inhibisyondur. Birden fazla polipeptit zinciri içeren allosterik enzimlerde, inhibitörlerin enzime bağlanması ile farklı alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşimlerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimlere bağlanarak onların aktivitelerini etkileyen bileşiklere “modülatör” denir. Bu moleküller substratın bağlandığı aktif bölge yerine farklı bir yere bağlanırlar.

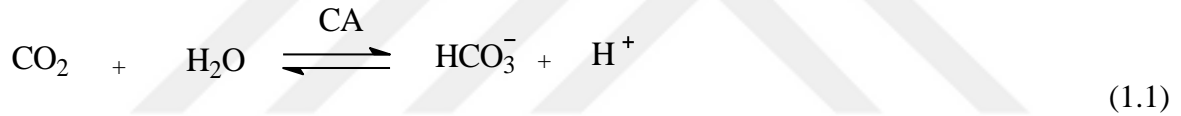
Homotropik, heterotropik ve homotropik-heterotropik olmak üzere üç tip allosterik enzim tespit edilmiştir. Homotropik allosterik enzimlerde substrat, konsantrasyonuna göre bizzat katalitik aktiviteyi artırıcı olarak etki yapar. Heterotropik allosterik enzimlerde ise, enzim substrattan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler de homotropik-heterotropik karakterde olup, modülatörlerden birisi o enzimin substratı,

diğerleri başka bileşiklerdir. Allosterik enzimlerin kinetiği, Michaelis-Menten enzim kinetiğinden daha farklıdır.

İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için en yaygın kullanılan yöntem Lineweaver-Burk grafikleridir. Bu yöntemde $1/V$ ye karşı $1/[S]$ grafiği sabit inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonda çizilerek K_i sabitleri hesaplanır. Kesim noktalarından değlendirmeler yapılır (Lehninger, 2005).

1.4. Karbonik Anhidraz (CA)

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidrolizaz E. C. 4. 2. 1. 1) eritrositleri de içine alan pek çok hücre tipinde pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilen ve aktif bölgesinde çinko (Zn^{+2}) iyonu içeren bir metaloenzimdir. Canlılarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran ve Scozzafava, 2001).



CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan salviası, sığır kemiği, sığır lokositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan da karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki moleköl kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein ve Silverman, 1984; Krungkrai vd., 2001; Beydemir vd., 2002; Beydemir ve Gülçin, 2004).

İnsanlarda CA'lar farklı dokularda bulunurlar. Örneğin: gastrointestinal, üreme ve sinir sistemlerinde, böbrekler, ciğerler, deri ve gözde (Supuran, 2004). Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda önemli bir role sahip CA'lar ayrıca organlar ile akciğer arasındaki CO_2 /bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, biyosentetik reaksiyonlarda (lipogenez, glukoneogenez ve üre sentezi), pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Supuran ve Scozzafava, 2000).

1.4.1. CA Sınıfları ve Organizmalardaki Dağılımı

Bu zamana kadar tanımlanmış tüm CA'lar α , β , γ , δ , ζ , η CA olarak altı farklı sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırma yapılırken proteinin üç boyutlu yapısı, amino asit dizilişi, aktif bölgenin yapısı ve katalitik özellikleri esas alınmıştır (Supuran, 2016; Liljas ve Laurberg, 2000; Hewett-Emmett ve Tashian, 1996).

α -Sınıfı CA: α -Sınıfı CA'ların prokaryotlarda dağılımı oldukça kısıtlı olup memelilerde bulunurlar (Smith ve Ferry, 2000). α -Sınıfı CA'lar ayrıca gelişmiş bitkiler, bazı bakteri ve siyano bakteriler, bazı mantar türlerinde ve tek hücreli canlılarda bulunurlar (Elleuche ve Pöggeler, 2010; Supuran, 2016).

β -Sınıfı CA: β -Sınıfı CA'lar, gelişmiş bitkilerde bulunan bitki enzimleridir (Hewett-Emmett ve Tashian, 1996). Bu sınıf CA'lar, kuaterner yapıları bakımından çok çeşitlidir (Rowlett, 2014). β -sınıfı CA'lar bakteriler, ökaryotlar ve arkealarda bulunmaktadır. Mikroalgler, bakteriler, siyanobakteriler, arkealar, mantarlar, C₃ ve C₄ bitkileri dahil çoğu organizmalar bu sınıf enzime sahiptirler (Rowlett, 2014).

γ -Sınıfı CA: γ -sınıfı CA'lar "Cam" olarak adlandırılır ve anaerobik arkea olan *Methanosarcina thermophila*'dan izole edilmiştir. Cam'ın amino asit dizilimi, CA'ların bilinen β -sınıfı ve α -sınıfı enzimleri ile herhangi bir benzerlik göstermemiştir (Alber ve Ferry, 1994).

δ -Sınıfı CA: δ -sınıfı CA marina diatomu olan *Thalassiosira weissflogii* canlısından izole edilmiştir (Roberts vd., 1997) ve TWCA1 olarak adlandırılır. Aktif bölgesinin yapısı α - ve γ -CA'larinkine benzer (Cox vd., 2000) fakat, TWCA1'in amino asit diziliminin, bilinen üç CA sınıfı ile önemli bir benzerliği olmadığı için bu sınıf δ -sınıfı CA olarak adlandırılmıştır (Tripp vd., 2001).

ζ -Sınıfı CA: ζ -sınıfı CA'lar Kadmiyum CA'lar olarak da bilinmektedir. Marina diatomu olan *T. Weissflogii*'den izole edilmiştir (Lane ve Morel, 2000). CDCA'nın bilinen diğer CA sınıflarının proteinleri ile önemli bir benzerliği olmadığı için ζ -sınıfı CA olarak adlandırılmıştır (Park vd., 2007).

η -Sınıfı CA: Bu sınıf CA'lar sadece Plasmodium cinsi enzimler tarafından temsil edilmektedir. η - CA'ların hiçbiri kristalize edilememiştir. Bu yüzden, bu proteinlerin yapısı hakkında kesin veriler henüz mevcut değildir. η -CA'lar yaklaşık 30 kDa'lık polipeptidler tarafından temsil edilmektedir (Del Prete vd., 2014; Supuran, 2016).

1.4.2. Memelilerdeki CA İzoenzimleri

Bir canlı organizmada aynı reaksiyonu katalizleyen ve farklı kimyasal yapıya sahip olan enzimlere izoenzim (izozim) denir. İzoenzimler substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı farklı ilgilere sahiptir. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında aminoasit sayısı ve sırasının farklı olması, her bir alt ünitenin ayrı geninin olması, izoelektrik pH değerinin farklı olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olmasının yanında ayrıca bir hücrenin farklı kısımlarında da bulunabilirler (Devlin, 2002). Karbonik anhidrazın şimdiki kadar önemli fizyolojik rol oynayan 16 tane izoenziminin olduğu tespit edilmiştir. Bu izoenzimler, birçok klinik uygulamalarda inhibitörlerinin tasarımı için önemli hedeflerdir. Aynı zamanda bunların katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır.

Bunlardan CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII sitozolik, CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV) membrana bağlı, CA VA, CA VB mitokondriyaldir. CA VI tükürükte salgılanır. Ayrıca üç tane katalitik olmayan formu mevcuttur bunlara CA alakalı protein denir (CARPs): CARP-VIII, CARP-X ve CARP-XI (Supuran, 2004). Son zamanlarda belirlenmiş olan CA-XV insanlarda ve diğer primatlarda eksprese olmazken, rodent ve yüksek omurgalılarda olur (Hilvo vd., 2005). CA XV'in katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, CA IX ve CA XII izoenzimlerinin ise tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori, 2004; Hilvo vd., 2005).

CA enziminin fizyolojik fonksiyonları, genel olarak insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu ortaya çıkarılmıştır.

hCAI izoenzimi insan eritrosit hücrelerinde bulunmuş olup insan kanından izole edildiğinde miktarı 12 mg/g hemoglobun olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde hem hCAI izoenzimi hemde hCA-II izoenzimi bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli işlevi doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan karbondioksiti bikarbonata, akciğer pulmoner kapilerde ise bikarbonatın karbondioksite dönüşmesi reaksiyonunu gerçekleştirerek solunum olayında yer almasıdır. hCAI izoenziminin turnover sayısı $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu hCAII kadar açık değildir. hCAI eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren ve Lindskog, 1992; Sly ve Hu, 1995; Supuran ve Scozzafava, 2001).

CA'nın en çok çalışılan formu hCAII izoenzimi olup insan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan hCAII izoenzimin miktarı 2 mg/g hemoglobin ve turnover sayısı 25 °C'de 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur.

hCAII ve hCAIV izoenzimleri göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda bol miktarda bulunmaktadır. Glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucunda hCAII izoenziminin önemi ortaya çıkarılmıştır (Renzi vd., 2000). Böbrek korteksinde membrana yapışık halde lokalize olan hCAII izoenzimi ile Na^+ ve H_2O 'nun geri emilimi sağlanmaktadır. Ayrıca hCAII izoenzimi ile ilgili olarak CAII eksikliği sendromu belirlenmiş olup bu durumun kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. Böylece hCAII izoenziminin beyin, böbrek ve kemik dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymuştur (Maren vd., 1997).

1.4.3. CA'nın Katalizlediği Reaksiyonlar

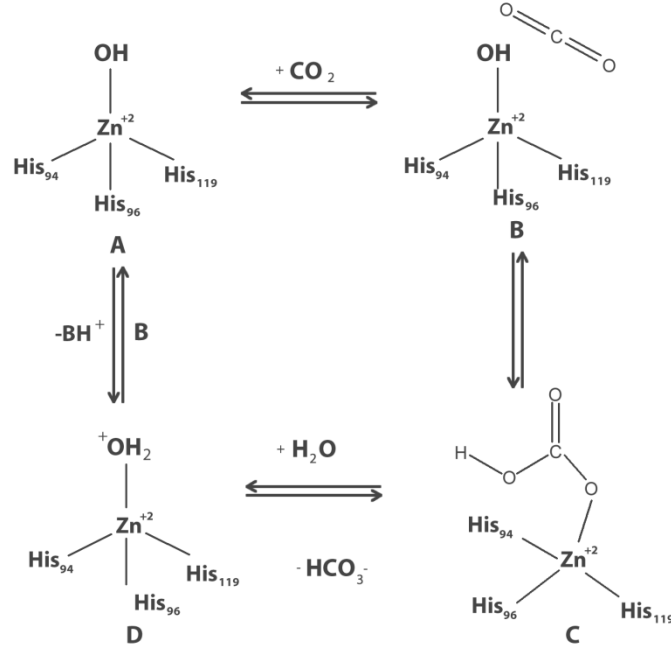
Karbonik anhidrazın karbondioksitin bikarbonata tersinir hidrasyonunun yanısıra, siyanatın karbamik asite veya siyanamidin üreye hidrasyonu, aldehidin geminal diol hidrasyonu, karboksilik ve sulfonik esterlerin hidrolizleri ve diğer mekanizmalara göre daha az araştırılmış hidrolitik reaksiyonlarında (Tablo 1) katalizlediği bilinmektedir (Supuran ve Scozzafava, 2007). CA enziminin hidrataz aktivitesinin dışında aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidrasyonu ve piruvik, sulfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik öneme sahip olup olmadığı açık değildir (Kaiser ve Lo, 1969; Jabusch ve Deutsch, 1989).

Tablo 1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$	(1.1)
$O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$	(1.2)
$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$	(1.3)
$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$	(1.4)
$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$	(1.5)
$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$	(1.6)
$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar: 2,4-dinitrofenil)	(1.7)
$PhCH_2OCOCI + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$	(1.8)
$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R: Me; Ph)	(1.9)

1.4.4. CA'ların Aktif Bölgesi ve Katalitik Mekanizması

CA enziminin aktif bölgesindeki Zn^{2+} iyonu, enzimin kataliz reaksiyonları için büyük öneme sahiptir. X-ray kristalografik verilere göre, metal iyonunun üç histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) ve bir H_2O molekülü veya $-OH$ iyonu tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 \AA derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğu görülmektedir. Çinko bağlı su sırayla Glu-106'nın karboksilat grubuna köprü olan Thr-199'un hidroksil grubu ile hidrojen bağı etkileşimleri ile tutunmaktadır. Bu etkileşimler çinko bağlı su molekülünün nükleofilikliğini geliştirmekte ve molekülü nükleofilik saldırı için elverişli bir konumdaki substrata (CO_2) yönlendirmektedir (Supuran ve Scozzafava, 2001). Zn^{2+} iyonuna hidroksit grubunun bağlanması ile enzimin aktif bir formu oluşur (Şekil 2.A). Bu güçlü nükleofil onun yakınındaki (zor substrat bağlama bölgesi, insan izozim CA II halinde kalıntısı Val 121, Val 143 ve Leu 198 ihtiva eder) bir hidrofobik cebe bağlı CO_2 molekülüne saldırır (Şekil 2.B) ve Zn^{2+} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 2.C). Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yer değiştirir ve çözelti içine geçer. Böylece Zn^{2+} iyonuna bağlı su molekülü (katalitik olarak inaktif) oluşur (Şekil 2.D) ve enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Stams vd., 1998; Supuran ve Scozzafava, 2001).



Şekil 2. CA enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonu kataliz mekanizmasının şematik gösterimi

1.4.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz enziminin kataliz mekanizmasının aydınlatılması, dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonlarının anlaşılması ile bu enzimin inhibitörlerinin ve aktivatörlerinin bulunması çalışmaları pek çok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Örneğin, göz retinasında bulunan CAII göz içi basıncı oluşumunun başlıca sorumlusudur ve glokom hastalığında yüksek göz içi basıncını düşürmenin en etkili yolu CAII aktivitesini bloke etmektir.

Bu amaçla başta asetazolamid olmak üzere -SO₂NH₂ (sülfonamid) fonksiyonel grubuna sahip heteroaromatik sülfonamidler karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörleri olup, uzun yıllardan beri klinikte kullanılmaktadır (Supuran, 2008; Supuran, 2012; Alterio vd., 2012; Fabrizi vd., 2012; Carta vd., 2012). Sülfamatlar ve sülfamidler, enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna bağlanırlar ve CAI'lerinin ana sınıfını oluştururlar. Bu sınıf inhibitörler anti-epileptik, anti-glokom, anti-kanser, anti-obezite ve diüretik ajanlar olarak uzun zamandır klinikte kullanılmaktadır (Supuran, 2008; Supuran, 2011; Alterio vd., 2012;; Supuran, 2012). İlaç piyasasında son yıllarda birçok sülfonamid kökenli ilaç grubu geliştirilmiştir (Supuran ve Scozzafava, 2000). Morfin (Çoban vd., 2007), melatonin (Beydemir ve Gülçin, 2004), kafeik asit fenetil ester (Göçer ve Gülçin,

2013), vitamin E (ArasHisar vd., 2004), bir seri fenolik asitler (Öztürk- Sarıkaya vd., 2010), bir dizi antioksidan fenoller (Şentürk vd., 2009), bir grup doğal ürün polifenoller ve fenolik asitler (Innocenti vd., 2010), antioksidan polifenol doğal ürünler (Innocenti vd. 2010), (3,4-dihidroksifenil) (2,3,4-trihidroksifenil) metanon ve türevleri (Nar vd., 2013), doğal ve sentetik bromofenoller (Akbaba vd., 2013; Balaydın vd. 2012), yeni fenolik sülfonamidler (Akıncioğlu vd., 2013), yeni fenolik benzilamin türevleri (Çetinkaya vd., 2013), dopamin ile ilişkili bileşiklerin sülfonamid analogları (Aksu vd., 2013) gibi birçok fenolik bileşiklerin CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmış ve bildirilmiştir. Bu çalışmalar CA enzim inhibitörlerinin önemini ortaya koymaktadır.

Birçok ilacın tedavi değerini oluşturan ilaç etken maddeleri genellikle bitkisel kaynaklı organik bileşiklerdir. Çağımızın öldürücü hastalığı olan kanser türlerinin tedavisinde kullanılan klasik tıbbi ilaçlarla tam olarak tıbben kalıcı ve iyileştirici bir sonuç alınamamaktadır. Tıbbi bitkilere rağbetin hızla artmasının nedeni bu bitkilerden elde edilen ilaç etken maddelerinin, sentetik yolla elde edilen etken maddelere göre daha spesifik etkiye sahip olmaları ve yan etkilerinin daha az olması veya bulunmamasıdır. Aynı zamanda doğal ve güvenli gıda kaynaklarına özellikle de bitki orjinli olanlarını teşhis etmeye ihtiyaç duyulduğundan son yıllarda biyoaktif gıda bileşenleri araştırmalarına olan ilgi gittikçe artmıştır.

1.4.6. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri

CA inhibitörleri ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmasına rağmen, CA aktivatörleri (CAA) ile ilgili yapılan çalışmalar az sayıdadır. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte X-ışını kristalografisi, elektronik spektroskopi ve kinetik ölçümler yardımıyla, aktivatörlerin, CA aktif boşluğu içinde, inhibitör veya substrat bağlanma bölgelerinden farklı bir yerde bağlandığı gösterilmiştir (Briganti vd., 1997; Temperini vd., 2006; Supuran, 2008; Alterio vd., 2012). Histamin, serotonin, katekolaminler gibi biyojenik aminler, amino asitler, oligopeptidler veya küçük proteinler gibi çoğu bileşik, insan CA izoenzimlerinin birçoğu için etkin CA aktivatörleridir (Briganti vd., 1997; Parkkila vd., 2006; Temperini vd., 2006; Supuran ve Scozzafava, 1999).

1.5. Fenolik Bileşikler

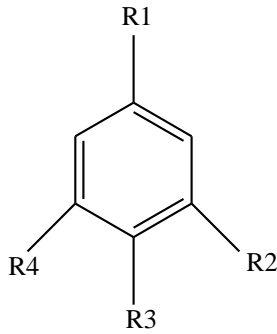
Fenolik bileşikler, aromatik halkaya bir ya da daha fazla -OH grubunun bağlı olduğu yapılardır (Balasundram vd., 2006; Robards ve Antolovich, 1997). Fenol bir -OH grubu içeren en basit fenolik bileşiktir. Fenolik bileşikler birden fazla hidroksil grubu içerdiğinde polifenoller olarak adlandırılır (Bravo, 1998). Bu zamana kadar bitkilerde birçok fenolik bileşik tanımlanmıştır (Naczka ve Shadidi, 2004). Sürekli olarak tükettiğimiz meyve, sebze ve tahıl ürünlerinde bol miktarda bulunur (Alasalvar vd., 2001). Fenolik bileşikler fitokimyasalların da önemli bir grubunu oluştururlar ve yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler (Robards vd., 1999; Middleton vd., 2000; Kahkonen vd., 2001).

Fenolik asitleri, flavonoidleri, tanninleri, kumarinleri, ve stilbenleri içeren 8000'in üzerinde fenolik bileşik birçok farklı doğal ürünlerden izole edilmiştir. Kimyasal yapısına göre her bir grup, kendi içinde alt gruplara ayrılır (Haminiuk vd., 2012; Manach vd., 2004,).

1.5.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler hidroksibenzoik ve hidroksisünamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. (Spacil vd., 2008).

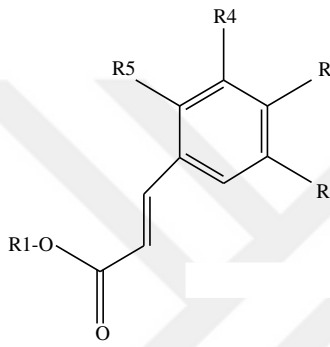
Hidroksibenzoik asitler, C₆-C₁ fenilmetan yapısına sahip olup, renksiz bileşiklerdir (Şekil 3). Benzoik asit türevleri bitkisel gıdalarda genellikle çok az miktarlarda bulunurlar. *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, protokatekuik asit, gallik asit, siringik asit en yaygın hidroksibenzoik asit türevleridir (Bravo, 1998; Tomas-Barberan ve Clifford, 2000; Annie ve Jean-Jacques, 2003).



Benzoik asit türevi	R1	R2	R3	R4
Benzoik asit	COOH	H	H	H
Gallik asit	COOH	OH	OH	OH
Protokatekuik asit	COOH	OH	OH	H
<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	COOH	H	OH	H
Vanilik asit	COOH	OCH ₃	OH	H
Siringik asit	COOH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Şekil 3. Benzoik asit türevleri

Hidroksisinasamik asitler C₆-C₃ fenilpropan yapısına sahip olup -OH grubunun konumu ve yapısına göre farklılık gösterirler (Şekil 4). Bitkisel gıdalarda bol miktarda bulunurlar. En yaygın olanları, klorojenik asit, *o*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit, sinamik asit ve sinapik asittir (Sosulski vd., 1982).

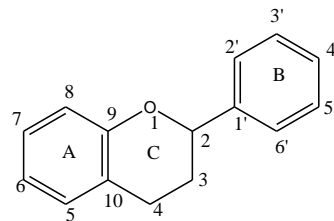


Sinamik asit türevi	R1	R2	R3	R4	R5
Klorojenik asit		H	OH	OH	H
Kafeik asit	H	H	OH	OH	H
<i>p</i> -Kumarik asit	H	H	H	OH	H
Ferulik asit	H	H	OCH ₃	OH	H
<i>o</i> -Kumarik asit	H	OH	H	H	H
Sinapik asit	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Sinamik asit	H	H	H	H	H

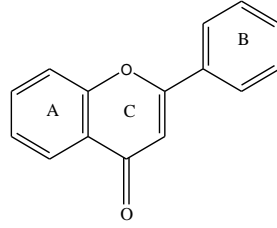
Şekil 4. Sinamik asit türevi

1.5.2. Flavonoidler

Flavonoidler, difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısındadırlar. Gıdalarda yaygın olarak bulunurlar. Flavonoidlerin flavon türevlerine flavonoidler, flavan türevlerine ise flavanoidler denir. Aromatik halkalar A ve B, heterohalka ise C ile gösterilir (Şekil 5, 6) (Harborne ve Williams, 2000). Flavonoidler 6 gruba ayrılırlar.

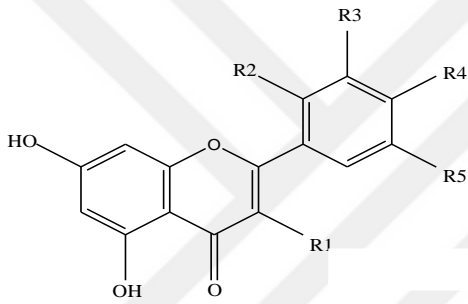


Şekil 5. Flavan yapısı



Şekil 6. Flavon yapısı

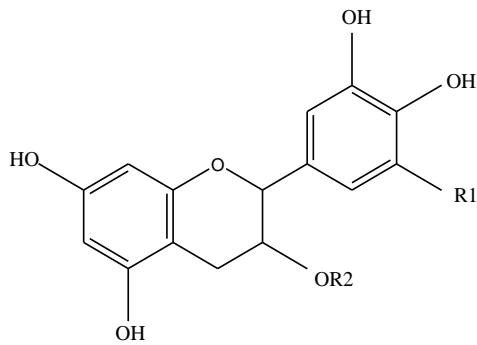
Flavonoller: Gıdalarda yaygın olarak bulunan flavonoller glikozid formunda bulunurlar (Şekil 7). Kampferol, mirisetin, kuersetin ve izoramnetin başlıca örnekleridir (Price vd., 1995).



Şekil 7. Flavonoller

Flavonoller	R1	R2	R3	R4	R5
Rutin	3-O-Rha-glu	H	OH	OH	H
Kampferol	O	H	H	H	H
Kuersetin	OH	H	OH	OH	H
Morin	OH	OH	H	O	H
İzoramnetin	O	H	OCH ₃	OH	H
Mirisetin	H	H	OH	H	OH
Fisetin	OH	H	H	OH	OH

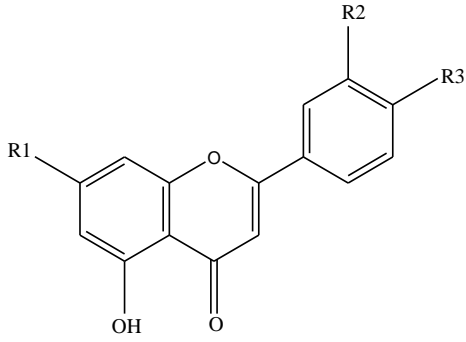
Flavanoller: Kateşinler bu grupta bulunurlar. C₃ atomunda bir OH grubu içerdiğinden flavan-3-ol olarak adlandırılır (Şekil 8) (Arts vd., 2000; Lakenbrink vd., 2000).



Şekil 8. Flavanoller

Flavanoller	R1	R2
Kateşin	H	H
Epikateşin	H	H
EGC	OH	H
ECG	H	Gallat
EGCG	OH	Gallat

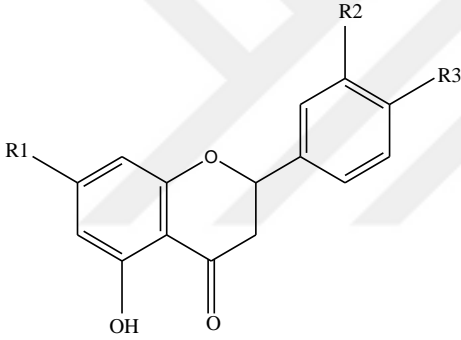
Flavonlar: Sebze ve meyvelerde bulunan en belirgin flavonlar apigenin ve luteolindir (Şekil 9) (King, 1962; Feng vd., 1988; Sartelet vd., 1996).



Flavonlar	R1	R2	R3
Apigenin	OH	H	OH
Luteolin	OH	OH	OH
Krisin	OH	H	H
Asasetin	OH	H	OCH ₃

Şekil 9. Flavonlar

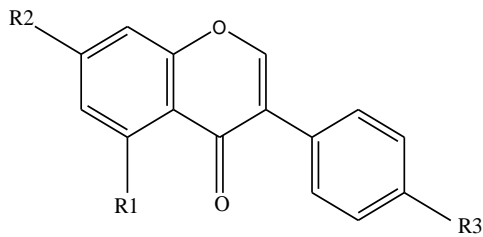
Flavanonlar: Genellikle glikozit formda bulunurlar. Turunçgil meyvelerinde bol miktarda bulunurlar. Naringin, naringenin ve hesperidin en yaygın olan flavanonlardır (Şekil 10) (Tomas-Barberan vd., 2000).



Flavanonlar	R1	R2	R3
Hesperetin	OH	OH	OCH ₃
Hesperidin	7-O-Rha-glu	OH	OCH ₃
Naringenin	OH	H	OH
Naringin	7-O-Rha-glu	H	OH
Eriositrin	7-O-Rha-glu	OH	OH
Eriodiktiol	OH	OH	OH

Şekil 10. Flavanonlar

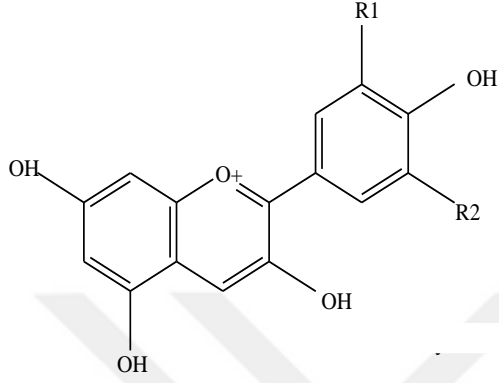
İzoflavonlar: Soya fasülyesinde bol miktarda bulunur. Ayrıca baklagillerde, bazı meyve ve sebzelerde bulunur. Daidzein ve genistein ve en yaygın olan izoflavonlardır (Şekil 11) (Coward vd., 1998).



İzoflavonlar	R1	R2	R3
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	7-O-Glu	OCH ₃
Daidzein	H	OH	OH
Daidzin	H	7-O-Glu	OH
Formononetin	H	OH	OCH ₃
Ononin	H	7-O-Glu	OCH ₃
Sissotrin	OH	7-O-Glu	OCH ₃

Şekil 11. İzoflavonlar

Antosiyanidinler: Daha çok üzümü meyvelerde bulunurlar ve suda çözünebilen pigmentler olup kırmızı, mavi ve mor meyve ve sebzelerin renginden sorumludur (Şekil 12) (Clifford, 2000; Es-Safi vd., 2002).

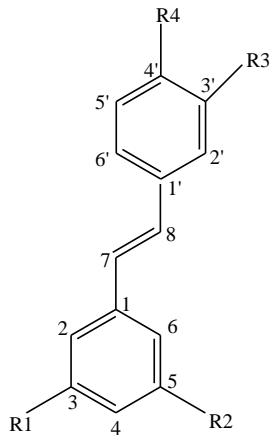


Antosiyanidinler	R1	R2
Delphinidin	OH	O
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Siyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H

Şekil 12. Antosiyanidinler

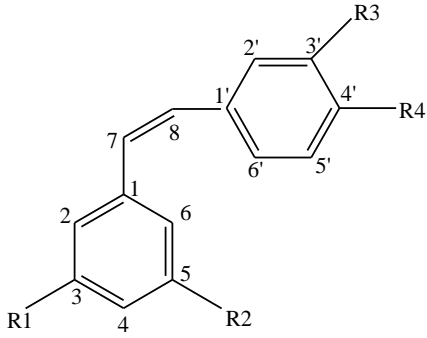
1.5.3. Stilbenler

Stilbenler iskeletleri 1,2-difeniletilen yapısında olup, bitki hastalık durumunda iken bitkinin direncini artırmak için sentezlenir (Goyal vd., 2012). Daha çok çam ağaçları, yer fıstığı ve üzüm asması tarafından sentezlenir. Trans- ve cis- formları vardır (Şekil 13, 14), (Bavaresco, 2003).



trans-Stilbenler	R1	R2	R3	R4
trans-resveratrol	OH	OH	H	OH
trans-piceid	GlcO	OH	H	OH
trans-astringin	GlcO	OH	OH	OH

Şekil 13. trans-Stilbenler

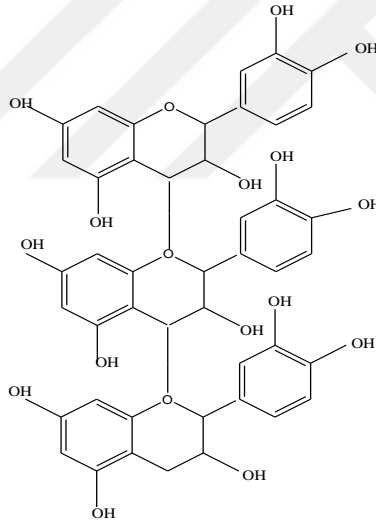


cis-Stilbenler	R1	R2	R3	R4
cis-resveratrol	OH	OH	H	OH
cis-piceid	GlcO	OH	H	OH

Şekil 14. *cis*-Stilbenler

1.5.4. Tanninler

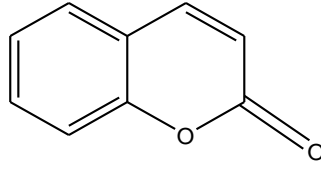
Yüksek molekül ağırlıklı, fenolik polimerlerdir (Şekil 15). Kateşin ve epikateşinin polimerleri besin tanninleri olarak bilinmektedir (Ignat vd., 2011).



Şekil 15. Tanninler

1.5.5. Kumarinler

Kumarinler, mantarlarda, bitkilerde, bakterilerde özellikle de yenilebilir bitkilerde bulunan sinnamik asit türevi fenolik bileşiklerin büyük bir sınıfını oluştururlar (Şekil 16). Kumarinlerin anti-inflamatuar, antiviral, antimikrobiyal, anti-tümör, antioksidan, antidepresan gibi geniş bir alanda biyolojik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Klenkar ve Molnar, 2015).



Şekil 16. Kumarinin kimyasal yapısı

1.6.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC (High Performance Liquid Chromatography), bir kromatografi tekniği olup, moleküllerin saflaştırılmasında, tanımlanmasında ve karakterizasyonunda sıklıkla kullanılır. HPLC alanında yapılan araştırmalar her geçen gün artmaktadır (Malviya vd., 2010). Günümüzde HPLC; proteinler, amino asitler, peptidler, nükleik asitler, karbohidratlar ve lipidler gibi farklı biyomoleküllerin analizinde sıklıkla kullanılan bir kromatografik tekniktir. Son zamanlarda bu tekniğin yerini alabilecek çok az sayıda rakip teknoloji bulunmaktadır (Tuncer, 2008).

1.6.1. HPLC'nin Temel Prensipleri ve Temel Kavramlar

Hareketli faz eluentin bileşenlerini sabit faz boyunca taşıyan çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarıdır. HPLC'de ayırma işlemi izokratik ya da gradient olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilir.

İzokratik elüsyonda, mobil fazın bileşimi ve oranı ayırma boyunca değişmez. Bileşenler sabit bileşimli tek bir çözücü ile sürüklenir. Gradient elüsyonda mobil fazın bileşimi aşamalı olarak değişir. Hem daha iyi bir ayırma sağlanır hem de analiz süresi daha kısadır. Farklı polariteye sahip iki veya daha fazla çözücü sistemi kullanılır (Kenkel, 1994).

Çözücü sisteminde bulunan bir hava kabarcığı çok ciddi ve kabul edilemez bir gürültüye sebep olmasının yanısıra akış hızında azalmaya neden olur. Bu gibi durumlarla karşılaşmamak için çözülmüş gazlar helyum ya da azot gazıyla ya da ultrasonik banyoda uzaklaştırılmalıdır. Ayrıca analiz sırasında meydana gelebilecek hava kabarcıklarının ve oksijen, azot gibi çözülmüş gazların giderilmesi için cihaza degasser (gaz giderici) ünitesi eklenir (Skoog vd., 1998).

HPLC'de ayırım performansını artırmak, dolgu materyalinde küçük partiküllerin kullanılmasını gerektirir. Yüksek basınçlı pompalar sayesinde analitin sabit faz ile

etkileşmesi sağlanır. 5000 psi'ye kadar çıkabilen maksimum basınç değeri, 0,01-10 mL/dk arasında akış hızı, % 1'den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı modern pompaların sahip olması gereken özellikler arasındadır. Ayrıca, pompadan gelen akış vurusuz olmalıdır. (Skoog vd., 1998; Cazes, 2005).

HPLC sisteminde analitin sisteme gönderilmesi işlemi enjeksiyon portundan manuel ya da otomatik enjektörlerle yapılan enjeksiyonla sağlanır. Enjeksiyon ünitesi 1 µL-500 µL aralıktaki hacimlere olanak vermelidir. Enjeksiyon yapıldıktan sonra analit yüksek basınçta hareket eden hareketli faza karışarak kolonda ayrılır (Skoog vd., 1998).

Analite ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve alıkonuldukları faza sabit faz denir. Kolonlar paslanmaz çelik, cam, teflon veya Polieter eter keton (PEEK) malzemeden üretilmektedir. Silika ve alümina esaslı kolon dolgu materyalleri genellikle tercih edilir. Kolon boyları genellikle 10, 15, 25 cm uzunluğunda, kolonların iç çapı 2-5 mm aralığındadır. Sabit fazın polaritesine göre iki çeşit kolon vardır. Ters faz kolonda sabit faz apolar, hareketli faz polardır. Normal faz kolonda sabit faz polar, hareketli faz apolardır (Kafalı, 2008).

HPLC'de ayırım gerçekleştirildikten sonra madde derişimleri kolon çıkışında bulunan bir dedektör yardımıyla ölçülür ve dedektörler alınan sinyalleri kromatogram üzerinde pik olarak ifade ederler. İyi bir dedektörde gürültü seviyesi düşük olmalı ve analitin küçük miktarları gözlemlenebilmelidir. Ayrıca iyi bir dedektör sıcaklık ve basınçtaki değişimlerden de etkilenmemelidir. HPLC'de bugüne kadar çalışma prensibi farklı olan çok sayıda dedektör geliştirilmiştir (Tarantilis vd., 1995; Kafalı, 2008).

1.6.2. Yaygın Kullanılan HPLC Dedektörleri

1.6.2.1. UV-Görünür Bölge Dedektörü (UV/VIS)

UV-Görünür bölge dedektörü (UV/VIS) ile ışığı absorplayabilen bileşenlerin tayini yapılır. Her bileşene göre dalga boyu ayarlanmaktadır. Spektrum taraması yapmak mümkündür. 190-800 nm aralığında çoğu organik moleküller ve fonksiyonel gruplar UV/VIS alanda elektromagnetik enerji absorplar. (Swartz, 2010).

1.6.2.2. Diyot Serili Dedektör (PDA)

Diyot serili dedektör ile analizler çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilir. Bu dedektör de spektrofotometrik temelli çalışır. 512 elementten oluşan bir yüzeye sahiptir. UV-görünür bölge dedektöründen farklı olarak her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorpsiyonu eş zamanlı olarak ölçülebilmektedir. İstenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmektedir. Bu özelliği sayesinde numunede yer alan piklerin belirlenmesi işleminin daha güvenilir bir şekilde yapılmasına olanak sağlar (Swartz, 2010).

1.6.2.3. Kütle Spektrometri Dedektörü (MS)

Uçucu olmayan sıvı karışımları önce LC sistemden geçirip bileşenlerine ayrılır, sonra ayrılan bileşen iyon haline getirilir ve kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırım yapılır. MS sistemlerinde ilk olarak ayırımın gerçekleştiği LC kısmından gelen hareketli faz uzaklaştırılır. Uzaklaştırma işlemi vakumla olabileceği gibi elektrosprey ve termosprey yöntemlerini kullanarak da uzaklaştırılabilir. Daha sonra mevcut bileşenin iyonlarına ayrışması için elektron bombardımanı (EB), elektrosprey iyonlaştırma (ESI), kimyasal iyonlaştırma (CI) üniteleri gibi iyonlaştırma kaynakları kullanılır (Swartz, 2010). Kütle spektrometri dedektörü (MS) ile kalitatif ve kantitatif analizler yapmak mümkündür.

1.7. Çayın Genel Özellikleri ve Bitkisel Çaylar

Çay dünya çapında yaygın olarak tüketilen içecektir. *Camellia sinensis* L. bitkisinin yaprak ve tomurcuklarından dört tip çay elde edilir: Beyaz çay (fermente edilmemiş), yeşil çay (fermente edilmemiş), Oolong çayı (yarı-fermente edilmiş) ve siyah çay (fermente edilmiş) (Şekil 17) .



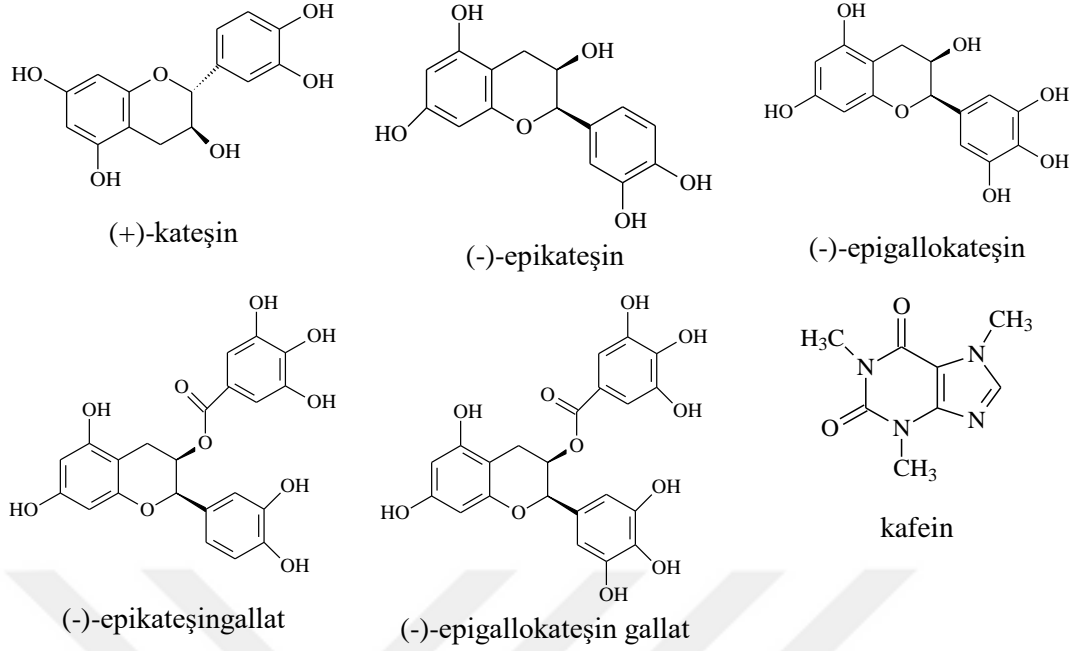
Şekil 17. Çay ürünlerinin dört farklı tipte (a: siyah çay, b: yeşil çay, c: beyaz çay, d: oolong çayı) fotoğrafları

Oolong çay, siyah ve yeşil çayın özelliklerini bünyesinde toplayan ve ülkemizde üretilmeyen bir çay çeşididir. Çin'in güneydoğusunda ve Taiwan'da ilkbahar ve kış aylarında elle toplanan yaş çay yapraklarından elde edilen yarı-fermente edilmiş kaliteli bir çaydır.

Beyaz çay, başta Çin olmak üzere Hindistan, Kenya, Sri Lanka ve Vietnam'da üretilen dünyanın en nadide ve en pahalı çayıdır. Beyaz çay ismini, üretiminde kullanılan açılmamış yaprak tomurcuklarının üzerini kaplayan ince beyaz tüylerden ve deminin çok açık sarı renkli olmasından alır. Yüksek oranda açılmamış tomurcuk içeren sürgünler toplandıktan sonra oksidasyonu önlemek için sıcak su buharı verilerek şoklanır. Soğutma işleminden sonra soldurma yapılır ve çok hafif şekilde uygulanan fermentasyonu takiben kurutularak beyaz çay üretimi gerçekleştirilir. Diğer çay çeşitlerinden farklı olarak beyaz çayda kıvrırma işlemi uygulanmaz.

Siyah çay, Batı ülkelerinde, Hindistan'da ve dünyanın diğer bölgelerinde tüketilen çayın en önemli biçimidir. Siyah çay, taze çay yaprakları ve tomurcuğunun soldurma, kıvrırma, fermentasyon ve kurutma işlemlerinden geçirilmesi ile üretilir. Soldurma çay sürgünlerinde polifenol oksidaz enzim aktivitesinin artmasına neden olur. Böylece fermentasyon aşamasında çay flavanolları polifenol oksidaz enzimi yardımıyla daha fazla oksitlenir ve sonuçta üretilen siyah çay deminin çeşitli özellikleri üzerine önemli etki yapan teaflavinlerin ve teurobiginin oluşmasını sağlar. Aynı zamanda kafein oluşumu da soldurma anında artar.

Özellikle Çin ve Japonya'da tüketilen yeşil çay ise özellikleri ve işlenmesi yönünden siyah çaydan tamamiyle farklıdır. Yeşil çayın işlenmesinde, yaş çay yaprakları doğrudan kısa bir süre için yüksek sıcaklık şokuna tabi tutulup içerdikleri polifenol oksidaz enzimi dahil tüm oksidasyon enzimlerinin inaktif hale geçmeleri sağlanmaktadır. Böylelikle fermentasyon yapılmadığı için üretilen çay yeşil renkli olmaktadır. Yeşil çayda fazlaca bulunan polifenolik maddeler kateşinler olarak adlandırılmaktadır. Çayda bulunan temel kateşin türevleri (-)-epikateşin (EC), (-)-epigallokateşin gallat (EGCG), (-)-epigallokateşin (EGC), (-)-epikateşingallat (ECG), (+)-gallokteşin ve (+)-kateşindir (Da Silva Pinto, 2013) (Şekil 18).



Şekil 18. Çayda bulunan temel kateşinler ve kafeinin yapısı

Taze çay yaprağında ayrıca diğer bir fenolik bileşik grubu olan fenolik asitlerden klorojenik asit, gallik asit, neoklorojenik asit ve *p*-kumaril kinik asit de bulunmaktadır. Polifenollere ek olarak, çay yaprakları metilksantinlerin (kafein, teofilin ve teobromin) önemli bir kaynağı olup ayrıca teanin amino asiti içerir. Metilksantinlerin merkezi sinir, kardiyovasküler, gastrointestinal, solunum ve böbrek sistemleri (Spiller, 1998) gibi bazı vücut sistemleri üzerinde fizyolojik ve farmakolojik etkileri vardır.

Yapılan araştırmalara göre çay tüketimi kalp damar hastalıkları (Da Silva Pinto, 2013) yüksek kolesterol düzeyleri (Vinson vd., 2004), diyabet, osteoporosis (Hegarty vd., 2000) ve diş çürüğü (Otake vd., 1991) risklerini azaltmaktadır. Çayın bu faydalı etkileri polifenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Çeşitli gıdalara hem antioksidan ve antimikrobiyel katkı maddesi olarak kullanılan hem de gıdaya fonksiyonel özellik kazandırmak amacıyla kateşinler ilave edilmektedir (Yılmaz, 2006).

Çay dışında infüzyonları hazırlanarak yaygın olarak tüketilen diğer bazı bitkisel çaylar ise ada çayı, ıhlamur, kuşburnu, papatya, karanfil, ekinezya, tarçın ve nane olarak sayılabilir (Şekil 19). Birçok araştırma bu bitkilerin de aynı çayda olduğu gibi kayda değer oranlarda antioksidan bileşikleri içerdiğini ortaya koymaktadır (Cvetkovikj vd., 2013; Horžić vd., 2009; Tumbas vd., 2012; Oniszcuk vd., 2016).

Adaçayı (*Salvia*) 1000'den fazla tür ile Lamiaceae familyasının en önemli ve en büyük cinsidir. *S. officinalis* L. antioksidan, anti-Alzheimer ve anti-inflamatuar aktivitesi

ile Avrupa'da yaygın bir tıbbi bitkidir. Aynı zamanda gıda endüstrisinde tatlandırıcı ve koruyucu madde olarak kullanılır (Topcu, 2006). Rozmarinik asit birçok ada çayı türünde en bol bulunan fenolik asit olup *p*-kumarik asit, prorokatekuik asit, kafeik asit, benzoik asit, *p*-OH benzoik asit, klorojenik asit, siringik asitte ada çayının türüne ve ekstraksiyon çözücüsüne göre değişiklik göstermektedir (Li vd.,2015; Kocak vd., 2016). Ada çayının yapısında bulunan başlıca flavonoidler ise kaempferol, mirisetin, morin, apigenin, kuersetin ve luteolindir (Cvetkovikj vd., 2013; Bahadori vd., 2017).

Ihlamur (*Tilia*), Malvaceae familyasına ait olup kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde yetişen uzun ömürlü yaprak döken bir ağaçtır. Ihlamurun yapısında bulunan başlıca fenolik asitler vanilik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve *p*-kumarik asit olup flavanoidler ise rutin, (-)-epikateşin, kuersetin ve kaempferoldür (Horžić vd., 2009; Ieri vd., 2015).

Kuşburnu (*Rosa canina*) örneklerdeki bazı organik asit (gallik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit) ve flavon türevleri (kateşin, eriositrin, rutin, apigenin, kuersetin, naringenin ve kaempferol) HPLC ile kantitatif olarak tespit edilmiştir (Demir, 2012). Kuşburnunun yapısında bulunan kuersetin ve ellajik asit bu bitkilerin önemli bileşikleridir (Tumbas vd., 2012).

Ekinezya (*Echinacea angustifolia*) türlerinin tıbbi olarak kullanımına imkan veren biyoaktif içeriğini oluşturan bileşikler kafeik asit türevleri (kikorik asit, ekinakozit, klorojenik asit, kafterik asit, kafeik asit, sinarin) karakteristik fenolik bileşikleridir (Mazza ve Cotrell, 1999; Oniszczuk vd., 2016).

Vallverdú-queralt (2014) ve arkadaşları tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) bitkisindeki pek çok fenolik bileşiği (gallik asit, siringik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kafeik asit, kumarik asit, ferulik asit, rozmarinik asit, kateşin, epikateşin, kuersetin ve rutin) tespit etmiştir. Bir başka çalışmada beş farklı tarçın türünün yapraklarında HPLC-DAD ile tanımlanan flavanoidler kuersetin, kaempferol ve kuersetindir (Prasad vd., 2009).

Papatya (*Chamomile*) Asteraceae familyasına ait güney ve doğu Avrupa'da yetişen tıbbi bitki türüdür. Yapısında sesquiterpenler, flavonoidler, kumarinler ve poliasetilenler en önemli bileşenleri olarak kabul edilir. Biyolojik olarak aktif fenolik bileşikler herniarin, umbeliferon (kumarin), klorojenik asit, kafeik asit (fenilpropanoidler), apigenin, luteolin (flavonlar), kuersetin, rutin (flavonoller) ve naringenin (flavanon) papatya özünde bulunur (Singh vd., 2011; Avula vd.,2014).

Karanfil (*Clove*) flavonoidler, hidroksibenzoik asitler, hidroksisünamik asitler ve hidroksifenil propenler gibi önemli fenolik bileşiklerin bitkisel kaynağıdır. Eugenol karanfilin ana biyoaktif bir bileşiğidir. Yapısında fenolik asitlerden gallik asit başta olmak üzere kafeik, ferulik, elagik ve salisilik asitler yer alır. Flavonoidler olarak kaempferol, kuersetin ve onların türevleri daha düşük konsantrasyonlarda karanfilde bulunur (Cortés-Rojas vd., 2014).

Nanenin (*Mentha*) yapısında az miktarda kafeik asit, apigenin, hesperetin ve naringenin tespit edilirken özünü tanımlanan ana fenolik bileşikler ise rozmarinik asit, neoponcirin, narirutin, klorojenik asit ve biokanindir (Tang vd., 2016). Farklı nane türlerinde yapılan birçok çalışmada başlıca fenolik asitler rozmarinik, kafeik, klorojenik, vanilik, siringik, *p*-kumarik, ferulik ve *p*-OH benzoik asit olup, flavonoidler ise apigenin, rutin, kateşin, kuersetin, naringenin, luteolin ve mirisetindir (Dorman vd., 2003; Proestos vd., 2005; Papageorgiou vd., 2008; Bimacr vd., 2011). Bitkisel çayların içerdikleri bu biyoaktif bileşikler gün geçtikçe bu ürünlere olan ilginin artışına neden olmaktadır.



Şekil 19. Çalışmada kullanılan bitkisel çayların fotoğrafları (a: adaçayı, b: ıhlamur, c: kuşburnu, d: ekinezya, e: tarçın, f: papatya, g: karanfil, h: nane)

Son birkaç yıldır yapılan çalışmalarda bitkilerde bulunan biyoaktif bileşiklerin de CA inhibisyon profili sergiledikleri görülmüştür. Yakın zamanda bitkisel kaynaklı kumarinlerin (Davis vd., 2013) ve çayda bulunan kafein (Sethi vd.,2012), *p*-hidroksibenzoik asit, *p*-kumarik asit, kaffeik asit, ferulik asit, gallik asit, şiringik asit ve elagik asit gibi fenolik bileşikler (Innocenti vd., 2010; Innocenti vd., 2010; Oztürk vd., 2011) ve resveratrol, kateşin, epikateşin, kuersetin, rutin, silmarin, dobutamine, apigenin, luteolin gibi bazı polifenolik ve flavonoidlerin ve renklendirici olarak kullanılan

kurkuminin doğal karbonik anhidraz inhibitörü olduğu çalışmalar sonucunda bulunmuştur (Oztürk vd., 2011; Sarıkaya vd., 2010; Şenturk vd., 2009; Koz vd., 2013). Bu bulgular CA enzimi ile ilgili hastalıkların tedavisinde geliştirilmiş ilaç benzeri özellikleri ile yeni kemotiplerin keşfinde doğal ürünlerin daha geniş kapsamda değerlendirilmesini desteklemek için bir platform sağlar. Aynı zamanda siyah çay, yeşil çay ve beyaz çaylardan elde edilen ham ekstraktların insan karbonik anhidraz hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerinde in vitro inhibisyon etkisi olduğu bulunmuştur (Sahin vd., 2012).

1.8. Gıda Katkı Maddeleri

Günümüzde piyasaya sürülen gıdalar pek çok kimyasal madde içermektedir. Bunların çoğu gıdanın doğal bileşenleri olan karbohidratlar, yağlar, proteinler, vitaminler ve mineral maddelerdir. Bu doğal bileşenlerin yanı sıra gıda işleme sırasında gıdaya istenilerek katılan ya da istenilmediği halde bulaşan birçok maddeler de bulunmaktadır. Gıda katkıları genel anlamda, bir ürünün ana bileşeni olmayıp fakat o ürünün işlenmesi, ambalajlanması veya depolanması sırasında farklı amaçlar için ürüne ilave edilen kimyasal madde veya maddeler karışımıdır. Gıda katkı maddeleri gıdaları renklendirmek, tatlandırmak ya da gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasına yardımcı olmak gibi belirli teknolojik fonksiyonları yerine getirmek amacıyla besinlere yoğun bir şekilde ilave edilir. Gıda sanayisinin hızla ilerlemesi nedeniyle katkı maddelerinin kullanımlarındaki hızlı artış, bu konudaki yasal düzenlemelerin gerçekleştirilmesini gerekli kılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization-FAO)'nün ortak çalışmaları ile oluşturulmuş Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission-CAC) katkı maddelerinin gıdalarda kullanımını ele almıştır. CAC 1992 yılında yayınladığı rehberde katkı maddelerini fonksiyonlarına göre sınıflandırmıştır. Avrupa Birliği (AB) direktiflerinde CAC'den farklı olarak yer alan bazı sınıflar olduğu gözlenmiş olup, ülkemizde de 1997 yılından itibaren geçerli olan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY) ve ekleri AB'deki ilkeler ve katkı grupları esas alınarak sınıflandırılmıştır. Buna göre gıda katkı maddeleri; antioksidanlar, renklendiriciler, asit düzenleyiciler, ambalajlama gazları, asitler, emülgatörler, emülsifiye edici tuzlar, hacim arttırıcılar, itici gazlar, koruyucular, jelleştirme ajanları, kabartma ajanları, kalınlaştırıcılar, köpürtme ajanları, köpürmeyi önleyici ajanlar, lezzet arttırıcılar, modifiye nişasta, nem vericiler, sertleştirici ajanlar, jelat ajanları, taşıyıcılar, stabilizörler,

tatlandırıcılar, topaklamayı önleyiciler ve un işleme ajanları olarak sınıflandırmıştır (Official Journal of the European Union (EC), 2008).

Antioksidanlar, gıdada oksidasyon reaksiyonları sonucu oluşan acılaşıma ve renk değişimi gibi bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddelerdir. Ayrıca gıdalara oksidasyonun başlangıcından önce ilave edildikleri zaman oksidasyonu önleyebilmekte veya azaltabilmektedirler. Gıda endüstrisinde pek çok kullanım alanına sahip olan antioksidanlar doğal kaynaklı (tokoferoller, askorbik asit ve tuzları, askorbil palmitat, askorbil asetat sülfidler) ve sentetik (eritorbik asit, sodyum eritorbat, gallatlar, butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Gıdalara asit düzenleyici olarak katılan maddelerin değişik fonksiyonları bulunmaktadır. Söz konusu bu maddeler başlıca sterilizasyon yardımcısı olarak kullanılmakta olup aynı zamanda gıdaların muhafazasında koruyucu etkiye sahiptir. En önemli fonksiyonlarından birisi de gıdaların tatlılık ve lezzet özelliklerini etkilemeleridir. Asit düzenleyiciler, şelat oluşturma fonksiyonlarının yanı sıra sebze ve meyvelerde enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarını önlemek amacıyla da kullanılmaktadır. Gıda sanayisinde kullanılan asitliği düzenleyicilerin asit, baz veya nötral pH'da maddeler olduğu, en yaygın olarak kullanılanların ise genellikle asitler olduğu ifade edilmektedir. Asetik, hidroklorik, sülfürik, süksinik, adipik, fumarik, laktik, malik, tartarik, sitrik asit, sodyum, potasyum, amonyum ve magnezyum karbonat, sodyum sülfat, sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum hidroksit en çok bilinen asitliği düzenleyicilerdir.

Gıda endüstrisindeki gelişmelerle birlikte hem üretim kapasitesini arttırmak hem de dokuyu, reolojik özellikleri ya da ürünün raf ömrünü modifiye etmek için emülgatör niteliğini taşıyan maddelerin kullanımını hızla artmaktadır. Bunlar ara yüzey hareketi ile emülsiyon oluşumunu sağlayan kimyasal maddelerdir. Doğal emülgatörler fosfolipidleri (lesitin, gliserid) içermekte olup sentetik emülgatörler ise propilen glikol, gliserin ve sorbitol gibi poliollerdir.

Gamlar; jelleştirici, kıvam arttırıcı, stabilize edici ve süspansiyon oluşturuca ajanlar olarak geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Gamların en önemli özellikleri arasında, sulu çözeltileri ve süspansiyonları jelleştirme ve kıvam arttırma fonksiyonları yer almaktadır. Doğal gamlar, gam arabik, guar gam, keçiboynuzu gamı, agar, aljinatlar ve karragenan olup doğada bulunurlar. Yarı-sentetik gamlar, nişasta selüloz gibi doğal maddelerin kimyasal türevleri (karboksimetil selüloz, metil selüloz, hidroksipropilmetil selüloz vb.) ve

doğal maddelerden mikrobiyal fermantasyon (ksantan gam, gellan gam, dekstran) ile türevlendirilirler.

Endüstride kullanılan gıdaları koruma yöntemlerinin uygulanamadığı ya da yetersiz kaldığı durumlarda gıdalara koruyucu madde katılımı söz konusu olmaktadır. Koruyucu maddeler (antimikrobiyaller), gıdayı mikroorganizmaların neden olduğu bozulmalara karşı koruyarak, gıdanın raf ömrünü uzatan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Benzoik asit ve tuzları, organik asitler, asetik asit ve asetatlar, sorbik asit ve tuzları, propiyonik asit ve tuzları, nitrat ve nitritler, parabenler, kükürt dioksit ve sülfidler, gıdalara ilave edilen koruyucu maddelerdir.

Kendilerine özgü lezzetleri olmayan ancak katıldıkları gıdanın lezzetini arttıran lezzet arttırıcılar kimyasal yapılarına bağlı olarak aminoasitler, nükleotidler ve maltol olmak üzere üç grupta sınıflandırılırlar. Dünyada en çok bilinen ve kullanılan lezzet arttırıcı madde monosodyum glutamat (MSG) olup L-glutamik asidin sodyum tuzudur.

Gıdanın rengini düzelteren veya gıdaya renk vermek amacıyla katılan maddelere renklendiriciler denir. Günümüzde gıda endüstrisinin gelişmesine bağlı olarak gıda ürünlerinin renklendirilmesi gereksiniminin başında tüketici açısından gıdanın daha çekici hale getirilmesidir. Renklendiriciler elde edilişlerine göre doğal ve yapay olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Doğal renklendirici maddeler mikrobiyal, bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan elde edilip birçok fiziksel ve kimyasal etkilere karşı (ısı, ışık, pH) stabiliteilerinin düşük olması ve gıdalarda kullanımlarında pekçok problem yaşanmasına rağmen, son yıllarda yapılan araştırmalarda sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı kullanımlarının arttığı gözlenmektedir. Örneğin; anatto, kurkumin, karotenler, likopen, antosiyaninler, kantaksantin, pancar kökü kırmızısı, sülfid-amonyum karamel vb. Yapay renklendiriciler, kimyasal sentez yoluyla laboratuarlarda üretilen kimyasal yapıları itibariyle doğada bulunmayan renk maddeleridir. Hemen hemen bütün yapay renklendiricilerin sentezinde kömür katranı kullanıldığı için kömür katranı renklendiricileri olarak da adlandırılmaktadırlar. Örneğin; Allura Red AC, Brown HT, amarant, Brilliant Black BN, Patent Blue V, Sunset Yellow FCF, azorubin, tartrazin vb. Bunların gıda işleme koşullarına karşı stabiliteilerinin yüksek olmasına karşın, stabiliteileri kullanılan ortama, renklendiricinin ve diğer kullanılan gıda katkı maddelerinin konsantrasyonuna, sıcaklık ve süre gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Yapay renklendiriciler en az bir tuz formundaki yapıya sahip olmalarından dolayı yüksek oranda suda çözünme özelliğine sahiptirler. Kimyasal yapılarında en yaygın olarak bulunan gruplar sülfonik asit (-HSO₃) ve karboksilik asit (-

COOH) dir. Kimyasal yapılarına göre azo (Allura Red AC, Sunset Yellow FCF, Ponceau 4R, Acid Red 1, Brilliant Black BN, Amarant, Karmoisin, Tartrazin), triaril metan (Patent Blue V, Brilliant Blue FCF), ksanten (Eritrosin), kinolin (Kinolin Sarısı) ve indigoid (İndigo Karmin) renklendiriciler olarak gruplandırılmaktadır. Renklendiricilerin gıdalarda kullanım alanları; alkolsüz içecekler, fırın, süt, şekerleme, et, balık, kuru karışım ürünleri, konserve meyve ve sebzelerdir.

Şelat ajanları gıdaların içinde serbest halde bulunan metal iyonları ile stabil ve genellikle suda çözünebilen kompleksler meydana getirerek, bunların neden olduğu renk bozulması, acılık ve besin değerinin kaybı gibi istenilmeyen reaksiyonları engelleyen maddelerdir. Bu maddeler antioksidan maddelerin etkinliklerini arttırmaları nedeniyle genelde gıdalara antioksidanlarla birlikte ilave edilmektedir. En yaygın şelat ajanları sitrik asit ve tuzları, fosfatlar, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve fitik asittir.

Gıdalara tatlı tadını veren ve şeker yapısında olmayan maddelere tatlandırıcı denir. Son yıllarda yüksek oranda karbohidrat, özellikle şeker tüketiminin insanlarda kardiyovasküler hastalıklar, obezite ve diğer metabolik bozukluklara neden olduklarının belirlenmesi ile şeker dışındaki tatlandırıcılara ilgi giderek artmıştır. Gıdalarda kullanılan tatlandırıcılara örnek olarak izomalt, sorbitol, aspartam, asesulfam K, sakkarin, siklamat, maltitol ve tomatin verilebilir.

Günümüzde tüketicilere daha fazla çeşitte gıda sunmak, gıdaların lezzet, koku, görünüş gibi duyuşal özelliklerini geliştirmek, gıdaların besleyici değerini korumak, gıdaları bozulmalara karşı korumak ve gıda işlemede yardımcı olmak gibi pek çok nedenlerden dolayı gıda üretiminde katkı maddelerinin kullanımı giderek artmaktadır. Gıdalarda çoğunlukla kullanılan ve aynı zamanda çalışmamızda kullanılacak olan gıda katkı maddeleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan gıda katkı maddeleri ve kullanım şekilleri

No	E Kod	Bileşik Adı	Kullanım Şekli
1	E131	Patent Blue V (Food Blue 5, Sulphan Blue)	Yapay renklendirici (triaril metan sınıfı)
2	E129	Allura Red AC	Yapay renklendirici (kırmızı azo boyası)
3	E102	Tartrazin	Yapay renklendirici (limon sarısı azo boyası)
4	E124	Ponceau 4R	Yapay renklendirici (mono azo boyası)
5	E110	Sunset Yellow FCF	Yapay renklendirici (mono azo boyası)
6	E133	Brilliant Blue FCF	Yapay renklendirici (triaril metan sınıfı)
7	E151	Brilliant Black BN	Yapay renklendirici (diazo boyası)
8	E127	Eritrosin B	Yapay renklendirici (ksanten sınıfı)
9	E123	Amarant	Yapay renklendirici (azo boyası)
10	E132	İndigo karmin	Yapay renklendirici (İndigoid sınıfı)
11	E100	Kurkumin (Natural Yellow 3, turmeric yellow)	Doğal renklendirici
12	E120	Karminik asit	Doğal renklendirici
13	E954	Sakkarin	Yapay tatlandırıcı
14	E950	Asesülfam K	Yapay tatlandırıcı
15	E951	Aspartam	Yapay tatlandırıcı
16	E330	Sitrik asit	Asitlik düzenleyici
17	E210	Benzoik Asit	Koruyucu
18	E200	Sorbik asit	Koruyucu
19	E300	Askorbik asit	Antioksidan
20	E321	Butil hidroksi toluen (BHT)	Antioksidan

Gıdaların korunmasında kullanılan bu katkılar hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kökenli olmaktadır. Fakat yapılan araştırmalara göre gıdalarda kullanılan bazı sentetik maddelerin canlılar üzerinde karsinojenik ve teratojenik etki gösterdiği ortaya çıkmıştır (Inoue vd., 2009). Bu nedenle doğal ürünlerin sentetik ürünlere tercih edilmesi giderek artmaktadır. Uzun yıllardır yapılan çalışmalar gösteriyor ki gıdaların renk, koku, tat, dayanıklılık ve raf ömrü gibi özelliklerini iyileştirmek için katkı olarak kullanılan baharat ve diğer bitkiler içerdikleri biyoaktif bileşenlerden dolayı giderek önem kazanmaktadır.

Literatürde gıda katkı maddelerinin karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi çok az çalışılmıştır. Az sayıda rastlanan bu çalışmalar, gıdalarda sentetik antioksidan olarak kullanılan butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve butillendirilmiş hidroksianisol

(BHA) (Şentürk vd., 2009) , renklendirici olarak kullanılan kurkumin (Innocenti vd., 2010; Şentürk vd., 2011), tatlandırıcı olarak kullanılan sakkarin (Kohler vd., 2007; Sonmez vd., 2014) ve yapay renklendirici olan Allura Red AC'nin karbonik anhidraz enzim inhibisyonudur.

Gıda katkı maddelerinin çoğunun CA enzimi üzerine etki edip etmediği bilinmemektedir. CA inhibisyonu veya aktivasyonunun metabolizma üzerine yapacağı etkinin belirlenmesi ve inhibisyona/aktivasyona neden olan bileşiklerin belirlenmesi için yapılacak olan çalışmalar değerlidir. Bu çalışmada gıda katkılarının BCA, hCAI ve hCAII üzerine etkilerinin ilk defa ortaya konulacak olması çalışmanın önemli özgün yanlarından biridir.

Gıda katkı maddesi içeren besinlerin çok tüketilmesi ile meydana gelecek yan etkilerin karbonik anhidraz enzimi ile ilişkisinin olup olmadığı bu çalışma ile ortaya konulmuş olacaktır. Ayrıca sakkarin ve kurkumin gibi bileşiklerin CA üzerine inhibisyon etkisinin ortaya konulması sonrası türevleri ile çok sayıda çalışmalar ortaya çıkmıştır (Sonmez vd., 2014; Şentürk vd., 2011). Benzer şekilde yapacağımız çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler ışığında CA üzerinde etki gösteren gıda katkı maddesi bileşik tipleri yeni inhibitör ve aktivatörlerin tespit edilmesinde öncülük edecektir.

1.9. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Gel Elektrofrez)

Elektriksel alanda, yüklü moleküllerin ayrılmaları esasına dayanıp proteinlerin büyüklüğü ve altbirimlerinin niteliğinin belirlendiği bu elektroforez tekniği proteinlerin analizinde sıklıkla kullanılır. Proteinler sahip olduğu amino asitlere bağlı olarak artı veya eksi yüke sahiptir. Protein molekülünü içeren bir çözeltiye elektrik akımı uygulandığında protein, büyüklüğüne ve net yüküne bağlı olarak belirli bir hızla hareket eder (Hames, 1998).

SDS-PAGE geliştirilmesiyle birlikte protein analizlerinde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bu yöntemde poliakrilamid jel kullanılır. Monomerlerin polimerleştirilmesiyle birlikte jel hazırlanır. Gözeneklerin boyutu küçük olarak ayarlanır, bu sayede istenilen proteinin ilerlemesi geciktirilir. Jelin polimerleşme derecesi pH, sıcaklık, N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) miktarına göre farklılık gösterir. Polimerleşme için TEMED katalizör olarak, serbest

radikal oluşumuna neden olan APS reaksiyon başlatıcı olarak rol oynar (Hames, 1998; Alberts vd., 2002).

Proteinler güçlü eksi yük taşıyan bir deterjan olan sodyum dodesilsülfat içeren bir çözelti içinde bulunur. Deterjan proteinlerin hidrofobik kısımlarına bağlanarak protein yapısının açılmasına neden olur. Betamerkaptoetanol gibi bir indirgeyici ajan proteinlerdeki S-S bağlarını kırmak amacıyla kullanılır ve çok alt birimli molekülleri oluşturan polipeptitlerin ayrı ayrı analizi bu sayede mümkün olur (Hames, 1998).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar, aletler, malzemeler ve markaları

Kullanılan Alet ve Cihazlar	Marka, Model
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Buchner hunisi	IsoLab
Derin dondurucu (-18 °C)	Vestel
Elektroforez Sistemi ve Görüntüleme Etüv	Biorad, Mini PROTEAN-Tetra Sistem
Hassas Terazı	Binder ve Nüve FN 120
HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)	Mettler Toledo MS204
	Agilent 1100 Series Degasser (Gaz giderici)
	Agilent 1100 Series Quad Pump (Dörtlü Pompa)
	Agilent 1100 Series VWD (Ultra Viyole dedektör)
	Agilent 1200 Series DAD (Diyot serili dedektör)
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph/MR 3001 K Hei-standard
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak, Jel Logic 2000
Kolon	C18, Ace 5 (250 mm * 4,6 mm i.d., 5 µm partikül)
Kurutma makinesi	Fantom
Mikropipet	Gilson (10-100 µL) & (100-1000 µL)
Mikro Santrifüj	Sigma, 1-14
Mikrotüpler için Termal Sallayıcı	Boeco, TS-100 Thermo Shaker
Öğütücü (Blender)	Waring Commercial Blender
pH metre	Hanna pH 211
Rotary vakum evaporatör	Heidolph
Santrifüj	Universal 320 R Hettich/Zentrifugen
Soğutmalı santrifüj	Beckman Coulter Allegra 64R
Termometre	
UV-Vis Spektrofotometre	ATI Unicam UV2
Vorteks karıştırıcı	IKA® Vortex Genius 3

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kimyasal adı	Üretici firma	Kimyasal adı	Üretici firma
2-merkaptoetanol	Sigma	<i>p</i> -OH benzoik asit	Sigma-Aldrich
Akrilamid	Merck	<i>p</i> -kumarik asit	Sigma-Aldrich
Amonyum Persülfat (APS)	Merck	Potasyum klorür (KCl)	Merck
Asetazolamid	Sigma-Aldrich	Protokatekualdehit	Sigma-Aldrich
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma-Aldrich	Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Carlo Erba	SDS-PAGE Standardı (116 kDa)	Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker
Benzoik asit	Sigma-Aldrich	Sepharose-4B	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma	Sinapik asit	Sigma-Aldrich
Bromfenol mavisi	Sigma-Aldrich	Siringaldehit	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck	Siringik asit	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck	Siyanojen bromür (CNBr)	Sigma-Aldrich
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich	Sitrik asit	Merck
Dekstroz	Merck	Sodyum asetat (NaCH ₃ COO)	Emsure [®] , Merck
Etanol	Merck	Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Emsure [®] , Merck
Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Sigma-Aldrich	Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Ferulik asit	Sigma- Aldrich	Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Fosforik asit (H ₃ PO ₄)	Emsure [®] , Merck	Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Gallik asit	Sigma- Aldrich	Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Emsure [®] , Merck
Gliserol	Sigma	Sodyum klorür (NaCl)	Carlo Erba

Tablo 4'ün devamı

Glisin	AppliChem	Sodyum nitrit (NaNO ₂)	Merck
HEPES	Ambresco	Sodyum perklorat (NaClO ₄)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck	Sodyum sitrat dihidrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O)	Merck
Kaffeik asit	Sigma- Aldrich	Sodyum sülfat (Na ₂ SO ₄)	Emsure [®] , Merck
Kateşin hidrat	Sigma- Aldrich	Sülfanilamid	Sigma-Aldrich
Kloroform	Merck	Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	Carlo Erba
Klorojenik asit	Sigma- Aldrich	<i>p</i> -nitrofenil asetat	Sigma-Aldrich
L-Tirozin	Sigma-Aldrich	Tris (hidroksimetil)-aminometan	Sigma
Metanol (HPLC grade)	LiChrosolv [®] , Merck	Vanilik asit	Sigma-Aldrich
N,N,N,N-Tetra Metil Etilen Diamin (TEMED)	Sigma	Vanilin	Sigma-Aldrich
N,N'-metilen bisakrilamid	Sigma		

Tablo 5. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Kullanılış Aşaması	Çözelti	Hazırlanışı
Sığır kanının pıhtılaşmasının önlenmesi	Asit-Sitrat-Dekstroz (ACD)	22 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O (sodyum sitrat dihidrat), 8 g sitrik asit ve 24 g dekstroz bir miktar saf suda çözülüp 1 L'ye tamamlanır.
Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi	4 M NaOH 0.1 M NaHCO ₃ (pH:10)	8 g NaOH saf suda çözülür, toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır. 2.1 g NaHCO ₃ 200 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 10'a ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanır.

Tablo 5'in devamı

Tirozin takılması	2 mg/mL <i>L</i> -Tirozin 0.2 M NaHCO ₃ (pH: 8.8)	80 mg <i>L</i> -tirozin 40 mL 0.1 M NaHCO ₃ (pH:10) içerisinde çözülerek hazırlanır. 1.68 g NaHCO ₃ 90 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 8.8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Sülfanilamid kenetlenmesi	1 M HCl 1 M NaOH 2.5 mg/mL Sülfanilamid 15 mg/mL NaNO ₂ 1 M H ₂ SO ₄	8.3 mL % 37'lik HCl (d: 1.19 g/mL) 80 mL saf suda çözülür toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır. 10 g NaOH 200 mL saf suda çözülür toplam hacim 250 mL'ye tamamlanır. 25 mg sülfanilamid buz banyosunda 10 mL 1M HCl içerisinde çözülerek hazırlanır. 75 mg NaNO ₂ 5mL saf suda çözülerek hazırlanır. 5.43 mL % 98'lik H ₂ SO ₄ (d:1.84g/mL) 80mL saf suda çözülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.
Sülfanilamid kenetlenmesi ve Esteraz aktivite ölçümü	0.05 M Tris-SO ₄ (pH:7.4)	6.05 g tris(hidroksimetil)-aminometan 900 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 1 M H ₂ SO ₄ ile 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.
Hemolizatın hazırlanması	İzotonik Tuz Çözeltisi (% 0.9 NaCl)	9 g NaOH 900 mL saf suda çözülüp toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.

Tablo 5'in devamı

Kolonun hazırlanması ve hemolizatın kolona uygulanması	Dengeleme Tamponu (25 mM Tris - 0.1 M Na ₂ SO ₄ pH: 8.7)	3.03 g Tris(hidroksimetil)-aminometan ve 14.2 g Na ₂ SO ₄ 900 ml saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 1 M HCl ile 8.7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.
	Yıkama Tamponu (25 mM Tris - 22 mM Na ₂ SO ₄ pH: 8.7)	3.03 g Tris(hidroksimetil)-aminometan ve 3.12 g Na ₂ SO ₄ 900 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 1 M HCl pH 8.7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.
Karbonik Anhidraz I Elüsyonu	hCA I Elüsyon Tamponu (50 mM Na ₂ HPO ₄ -1 M NaCl pH: 6.3)	3.55 g Na ₂ HPO ₄ ve 29.25 g NaCl 450 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 1 M HCl ile 6.3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 500 mL'ye tamamlanır.
Karbonik Anhidraz II Elüsyonu	CA II Elüsyon Tamponu (0.1 M CH ₃ COONa-0.5 M NaClO ₄ pH: 5.6)	3 g NaOH, 9.19 g NaClO ₄ ve 2.04g CH ₃ COONa 125 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 1M HCl ile 5.6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim 150 mL'ye tamamlanır.
Sığır Karbonik Anhidraz Elüsyonu	BCA Elüsyon Tamponu (0.1 M CH ₃ COONa - 0.5 M NaClO ₄ pH: 5.6)	9.19 g NaClO ₄ ve 2.04 g CH ₃ COONa 120 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 1M HCl ile 5.6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim 150 mL'ye tamamlanır.
Karbonik Anhidraz Esteraz aktivitesi tayini	3 mM <i>p</i> -nitrofenil asetat (substrat)	135 mg <i>p</i> -nitrofenil asetat 5 mL aseton ile çözülür ve magnetik karıştırıcıda hızlıca karıştırılan 245 mL saf suya yavaşça damla damla ilave edilerek hazırlanır.
Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi tayini	2.5 mM HEPES çözeltisi	6.51g HEPES 800 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 8.8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlanır.
	Doygun CO ₂ çözeltisi	250 mL saf sudan 40-45 dakika boyunca CO ₂ gazı geçirilerek hazırlanır.

Tablo 5'in devamı

Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri tayininde kullanılan standart inhibitörler	0.025 M Sülfanilamid	215 mg sülfanilamid 50 mL asetonitril de çözülerek hazırlanır.
	0.005 M Asetazolamid	55 mg asetazolamid 50 mL asetonitril de çözülerek hazırlanır.
Kalitatif protein tayini	Standart serum albumin (BSA) çözeltisi (1.2 mg/mL)	1.2 mg standart serum albuminin 1 ml saf suda çözülmesiyle hazırlanır.
Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini	Bradford Reaktifi	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL % 95'lik etanolde çözülür, üzerine 100 mL % 85'lik H ₃ PO ₄ eklenir ve toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.
	Standart BSA çözeltileri	Standart BSA'dan 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 mg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlanır.
Diyaliz işlemi	Aktifleştirme Tamponu (100 mM NaHCO ₃ -10 mM EDTA pH:7.4)	8.4 g NaHCO ₃ ve 3.72 g EDTA 900 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.
	10 mM PBS	0.863 g Na ₂ HPO ₄ , 0.471 g NaH ₂ PO ₄ , 8.02 g NaCl ve 0.18 g KCl 900 mL saf suda çözülür, çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.
	10 mM EDTA-10 mM PBS	3.72 g EDTA 10 mM PBS içerisinde çözülür toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.
	% 0.1 Kloroform	1 mL kloroform 1 L saf suda çözülür.

Tablo 5'in devamı

SDS-PAGE	Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH: 8.8)	45.42 g Tris 200 mL saf suda çözülür, pH: 8.8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanır ve +4 °C saklanır.
	Yığıma Jeli Tamponu (1.0 M Tris-HCl pH: 6.8)	30.28 g Tris 200 mL saf suda çözülür, pH: 6.8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlanır ve +4 °C saklanır.
	% 10 (w/v) Sodyum Dodesil Sulfat (SDS)	10 g SDS 20 mL saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanır.
	% 10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS)	1 g APS bir miktar saf suda çözülür ve hacmi 10 mL'ye tamamlanır ve -20 °C'de saklanır.
	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Orijinal şişesinden kullanıldı.
	Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30 m/v)	29.2 g akrilamid ve 0.8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülür hacmi 100 mL'ye tamamlanır ve +4 °C'de saklanır.
	Bromofenol Mavisi (% 0,1 m/v)	10 mg bromofenol mavisi saf suda çözülür ve hacmi 100 mL'ye tamamlanır.
	SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi	150 µL 1 M Tris-HCl (pH: 6.8), 400 µL % 10 SDS, 100 µL % 0,1 bromofenol mavisi, 250 µL % 80 gliserol ve 60 µL 2-merkaptolanolün karıştırılmasıyla hazırlanır ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklanır.
	SDS-PAGE Yürütme Tamponu	7.2 g Tris ve 1.5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (% 10) çözeltisi ilave edilir, pH: 8.3'e ayarlanır ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlanır.

	Jel Boyama Çözeltisi	1 g Coomassie Brilliant Blue-R250'nin 62.5 mL glasiyal asetik asit ve 93.5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlanır.
	Boya Uzaklaştırma Çözeltisi	100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlanır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Eritrositlerden İzolasyonu

Afinite kromatografisi, karbonik anhidraz izoenzimlerinin eritrositlerden izolasyonunda en çok kullanılan yöntemdir. Bu çalışmada da Sepharose-4B'ye kenetlenmiş sülfanilamidin kullanıldığı afinite kromatografisi uygulandı. Kolondan ayrılan enzim elüatlarındaki istenmeyen bileşenler diyaliz edilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra enzim çözeltileri dondurup kurutma (liyofilizasyon) yöntemi ile değiştirildi.

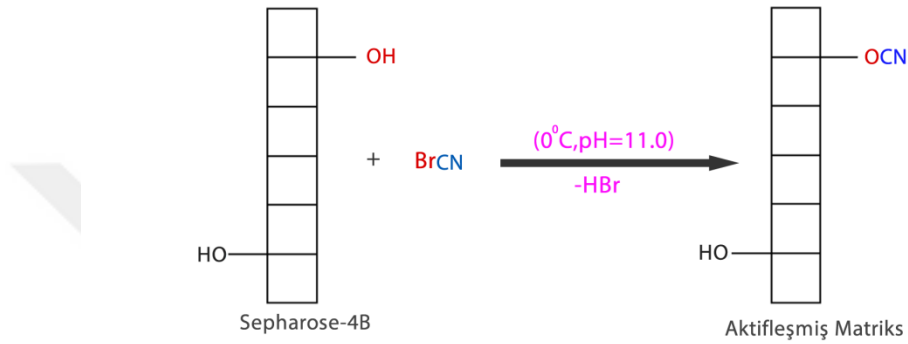
2.2.1.1. Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jelinin hazırlanmasında pek çok araştırmada uygulanmış olan Sepharose 4B'nin serbest hidroksil gruplarının siyanojen bromür (CNBr) ile aktifleştirilmesinden sonra tirozinin kovalent olarak takılması ve son olarak sülfanilamidin diazolanarak kenetlenmesi yolunun izlendiği yöntem kullanıldı. Tirozin afinite jelinin uzantı kolu olarak, sülfanilamid ise karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olması nedeniyle enzimi kolonda tutmak amacıyla kullanıldı.

2.2.1.1.1. Sepharose-4B'nin Aktifleştirilmesi

Aktifleştirilmiş Sepharose-4B jelini hazırlamak için 20 mL jel buz banyosunda soğuk saf su ile birkaç kez yıkandı ve her yıkama sonunda sulu kısım uzaklaştırıldı. Son olarak jel eşit hacimde saf su ile birleştirildi. Bu süspansiyon manyetik karıştırıcı ile yavaşça karıştırıldığı sırada üzerine 4 g toz halindeki CNBr ilave edildi. CNBr toksik olduğundan bu işlemler çeker ocakta kapalı ortamda yapıldı. Buz banyosunda karıştırma

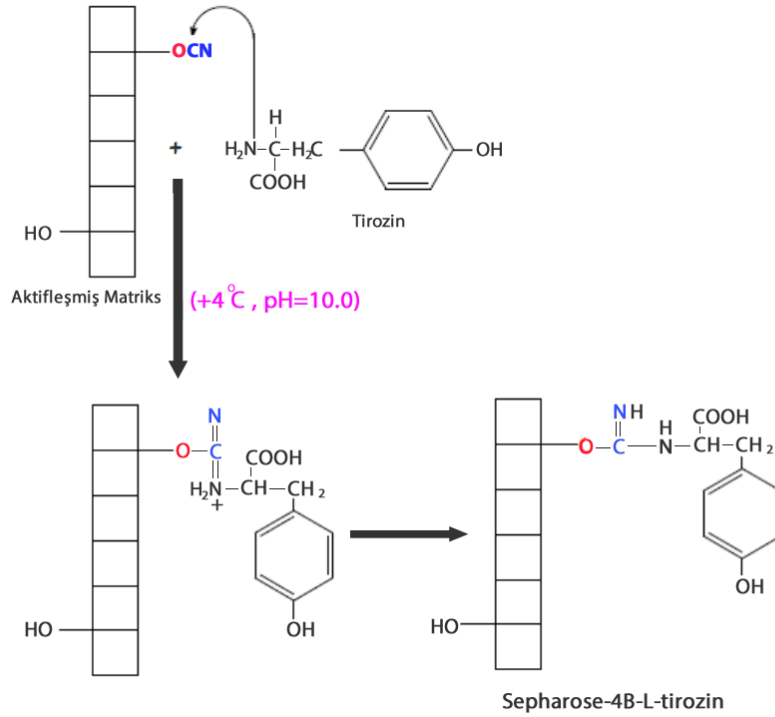
işlemi devam ederken ortamın pH'sını 11'e getirmek için 4 M NaOH çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi ve ortamın sıcaklığını düşük tutmak için ara ara saf sudan hazırlanmış buz ilave edildi. Yaklaşık 15 dk sonra pH 11'de sabitlenince, ortama bol miktarda buz ilavesi yapıp karışım Buchner hunisinden süzüldü. Son olarak 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ (pH:10) çözeltisi ile yıkama yapıldı ve jel bir behere aktarıldı. İşlemler sırasında gerçekleşen reaksiyon Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 20. Sepharose-4B Jelinin Aktifleştirilmesi

2.2.1.1.2. Tirozin Takılması

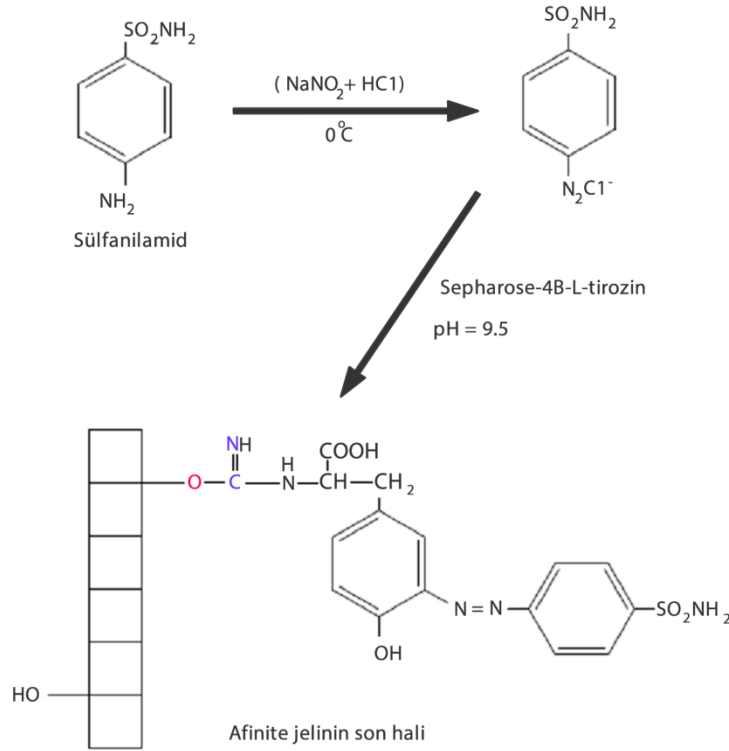
0.1 M NaHCO₃ tamponu ile yıkanmış jel üzerine, aynı tamponun 40 mL'sinde 80 mg *L*-tirozin çözünmesiyle hazırlanan çözelti ilave edildi. Aktifleştirilmiş Sepharose-4B jelinin pH'sını 11'de sabitledikten sonra, jelin tamponla yıkanması ve tirozin çözeltisi ile karıştırılması işlemleri 90 saniyeyi geçmeyecek şekilde yapılmaya çalışıldı. Sürenin uzatılması halinde kararlılığı oldukça düşük olan CNBr ile aktifleştirilmiş gruplar (-OCN) tekrar -OH gruplarına dönüşür ve tirozin takılması mümkün olmaz. Süspansiyonu +4 °C'de 2 saat süreyle buz banyosunda yavaşça karıştırarak tirozin bağlanması tamamlanmış oldu. Ardından +4 °C'de 16 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda jel yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol saf su ile yıkandı. Bu şekilde reaksiyona girmemiş tirozin ortamdan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra jel bir de 100 mL 0.2 M NaHCO₃ (pH: 8.8) ile yıkandı. En son aşamada tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içerisine alındı. İşlemler sırasında gerçekleşen reaksiyon Şekil 21'de gösterilmiştir.



Şekil 21. Aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması

2.2.1.1.3. Sülfanilamid Kenetlenmesi

25 mg sülfanilamid buz banyosunda 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. Buz banyosunda bekletilen 75 mg NaNO₂ içeren 5 mL çözeltiden damla damla sülfanilamid çözeltilisine ilave edildi. Yaklaşık 10 dk içerisinde amonyağa benzer keskin bir koku gelmesi ile sülfanilamid çözeltilisinin diazolandığı anlaşıldı. Hazır olan sülfanilamid çözeltisi, içerisinde sepharose-4B-L-tirozin bulunan 40 mL süspansiyon üzerine ilave edildi. Süspansiyonun pH'sı 1 M NaOH çözeltisi ile 9.5'e ayarlandı, jelin rengi pH 8 civarındayken kırmızıya dönmeye başladı. pH: 9.5'deki kırmızımsı renkteki jel oda sıcaklığında 3 saat yavaşça karıştırıldı. Bu işlemlerden sonra jel Buchner hunisinden süzüldü ve önce 1 L saf su sonra 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ (pH: 7.4) tamponu ile yıkandı. Bu işlemleri yaparken jelin kurutulmamasına dikkat edildi. Bu yıkamalardan sonra jel Tris-SO₄ (pH: 7.4) tamponu içerisine alındı ve kolona yüklenene kadar +4 °C'de bekletildi. İşlemler sırasında gerçekleşen reaksiyon Şekil 22'de gösterilmiştir.



Şekil 22. Sepharose-4B-L-tirozin'e diazolama aracılığıyla sülfanilamidin kenetlenmesi reaksiyonları

2.2.1.2. Kan Temini ve Hemolizat Hazırlanması

Araştırmada kullanılan insan kanı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Kan Bankasından son kullanma tarihi henüz geçmiş ve gerekli testlerden geçirilmiş kanlardan temin edildi. İnsan kanı kullanımını içi etik kurul belgesi (2015/119) alındı (Ek 1).

Sığır kanı ise mezbahadan taze olarak alındı ve bekletilmeden ayırma işlemine başlandı. Sığır kanı alınacak kap içerisine kanın pıhtılaşmasını önlemek için önceden antikoagülan hazırlandı. Bunun için asit-sitrat-dekstroz (ACD) çözeltisi antikoagülant olarak kullanıldı. 100 mL kana hazırlanan bu çözeltiden 15 mL ilave edilir. Böylelikle hem pıhtılaşma önlenmiş hem de eritrositler için uygun bir beslenme ortamı hazırlanmış olundu.

Öncelikle eritrositleri ayırmak için alınan taze kan 10 mL'lik santrifüj tüplerine doldurularak 15 dakika 2500 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında bulunan plazma ve lökosit tabakası pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin alt kısmında kalan eritrositler izotonik tuz çözeltisiyle (% 0.9 NaCl) üç defa

yıkandı. Yıkamalar sırasında her defasında 2500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlenerek üstteki kısmın uzaklaştırılması işlemleri tekrarlandı. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 1.5 katı soğuk saf su ile hemoliz edildi. Daha sonra eritrositlerin tam olarak hemoliz olması için +4 °C'de yarım saat magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Elde edilen hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak amacıyla +4 °C'de 20.000 rpm'de 40 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki hemolizat pastör pipet ile alınarak bir beherde toplandı. İşlem sırasında alt kısımdaki hücre zarlarından oluşan kısmın alınmamasına dikkat edildi. Hemolizat manyetik karıştırıcıda karışırken katı Tris kullanılarak pH'sı 8.7'ye ayarlandı. Bu şekilde kolona verilene kadar +4 °C'de saklandı. En geç birkaç gün içerisinde hazırlanan hemolizat kolona verildi.

2.2.1.3. Kolonun Hazırlanması (Paketlenmesi) ve Hemolizatın Kolona Uygulanması

Hazırlanmış olan afinite jelin üst kısmındaki sıvı uzaklaştırıldı ve dengeleme tamponu (25 mM Tris-0.1 M Na₂SO₄, pH: 8.7) ilave edildi. Aynı zamanda alt ucunda sinterleşmiş camdan oluşan süzme sistemi bulunan kolon da dengeleme tamponu ile dolduruldu ve peristaltik pompa çalıştırılarak boruların dengeleme tamponuyla dolması sağlandı. Ardından kolonun üst kısmı kapatılarak borunun ucu dengeleme tamponuna daldırılıp boru sisteminin tamponla dolması ve kabarcık kalmaması sağlandı. Kolondaki sıvı seviyesi kolonun üst kısmından az aşağıda olacak ve cam kısmından görülecek şekilde ayarlandı. Daha sonra eluat akış hızı saatte 20 mL olacak şekilde peristaltik pompa dönüş hızı ayarlandı ve borunun ucu jel süspansiyonuna daldırılarak jel kolona yavaşça yüklendi. Jelin kolona paketlenmesi sırasında jelde herhangi bir kabarcık ve çatlak oluşmamasına özen gösterildi. Bu işlemlerin ardından akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde sabit tutulup, jel dengeleme tamponu ile 24 saat boyunca dengelenmeye bırakıldı. Bu hız enzimlerin elüsyonunda da aynen uygulandı.

Sığır ya da insan eritrositlerinden elde edilen hemolizat yüklenmesi, uygulamaya hazır hale getirilen sisteme akış hızı değiştirilmeden dengeleme tamponundan çıkarılan borunun ucunun hemolizat içerisine daldırılmasıyla yapıldı. Hemolizat yüklemesi tamamlandıktan sonra hemolizattan kaynaklanan istenmeyen bütün bileşikler kolondan uzaklaştırmak için sisteme yıkama tamponu (25 mM Tris-22 mM Na₂SO₄, pH: 8.7) yüklendi. Böylece sığır karbonik anhidraz enzimi ya da insan karbonik anhidraz I ve II

izoenzimleri kolonda tutturuldu. Yıkama işlemine hemoglobinden kaynaklanan kırmızı rengin kaybolması ile eluatın 280 nm'deki absorbans değeri 0.02'nin altına düşünceye kadar devam edildi.

2.2.1.4. Karbonik Anhidraz I Elüsyonu

Kolana tutturulan karbonik anhidraz I izoenziminin afinite kolonundan elüsyonu için karbonik anhidraz I elüsyon tamponu (50 mM Na₂HPO₄ - 1 M NaCl, pH: 6.3) kullanıldı. 20 mL/saat akış hızı ile 15 dakikada bir tüp değiştirilerek 5mL'lik kısımlar halinde enzim cam tüplere toplandı. Bu işleme elüatların 280 nm'deki absorbansları 0.02'nin altına düşene kadar devam edildi. Tüplerde toplanan eluatlar testlerde kullanılana kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.1.5. Karbonik Anhidraz II Elüsyonu

Karbonik anhidraz I izoenziminin afinite kolondan alınmasının ardından karbonik anhidraz II elüsyon tamponu (0.1 M CH₃COONa-0.5 M NaClO₄, pH: 5.6) kolona akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde uygulandı. Elüatlar 5'er mL'lik fraksiyonlar halinde cam tüplere toplandı. Bu işleme tüplerde toplanan elüatların 280 nm'deki absorbansı 0.02'nin altına düşünceye kadar devam edildi ve elüatlar testlerde kullanılana kadar +4 °C'de muhafaza edildi. Elüsyon işlemi tamamlandıktan sonra afinite kolonuna tekrar dengeleme tamponu yüklendi ve bir sonraki kullanıma kadar dengeleme tamponu içinde kolonda +4 °C'de saklandı.

2.2.1.6. Sığır Karbonik Anhidraz Elüsyonu

Kolona yüklenen sığır hemolizatının ardından, kolonda tuttulan sığır karbonik anhidraz enziminin kolondan elüsyonu için sığır karbonik anhidraz elüsyon tamponu (0.1 M CH₃COONa - 0.5 M NaClO₄, pH: 5.6) 20 mL/saat akış hızı ile kolona uygulandı. Her 15 dakikada bir 5'er mL'lik enzim cam tüplere toplandı. Enzim toplama işlemine 280 nm'deki absorbans 0.02'nin altına düşünceye kadar devam edildi ve elüatlar +4 °C'de muhafaza edildi. Elüsyon işleminin ardından kolona dengeleme tamponu verildi ve bir dahaki hemolizat yüklenmesine kadar jel +4 °C'de saklandı.

2.2.2. Protein Tayini

2.2.2.1. Yarı Kantitatif Protein Tayini

Metodun esası, proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin 280 nm'de maksimum absorbands göstermesine dayanmaktadır (Segel, 1968). Tüplerde 5'er mL'lik kısımlar halinde toplanan bütün fraksiyonlarda yarı kantitatif protein tayini yapıldı. Tüplerdeki eluatlar kuvars küvetlere alınarak, 280 nm'deki absorbandsı elüsyonda kullanılan tampona karşı okundu. Bu ölçümler protein varlığını teyit etmek için kullanıldı.

2.2.2.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Ayrıca eluatlardaki enzim miktarının ve aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmak üzere modifiye Bradford metodu (Coomassie Brilliant Blue yöntemi) ile protein miktarları belirlendi. Yöntemin esası fosforik asitli ortamda proteinlere Coomassie Brilliant Blue G250'nin bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 595 nm'de maksimum absorbands vermesine dayanmaktadır. Boyanın proteine bağlanması çok hızlı olup yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Bu metoda göre öncelikle 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden sığır serum albümin (Bovine Serum Albumin, BSA) standardı hazırlandı. Bu stok protein çözeltisinden tüplere ayrı ayrı 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 100µL'ye tamamlandı. Daha sonra tüplere 5 mL Coomassie reaktifi ilave edildip vortekslendi ve tüplerin 595 nm'deki absorbands değerleri köre karşı ölçüldü. Kör olarak saf su kullanıldı.

Testlerde numune hacmi olarak 100 µL eluat alındı. Üzerine doğrudan Coomassie reaktifi ilave edildi. Kör olarak da protein çözeltisi yerine 100 µL numunelerdeki tampon (elüsyon tamponu) kullanıldı.

Absorbans değerlerine karşılık gelen mg/mL protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılan numuneler için de aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

2.2.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

Tüplerde toplanan elüatlarda karbonik anhidraz aktivite tayinleri hidrataz ve esteraz aktivitesi olmak üzere iki yöntemle yapıldı.

2.2.3.1. Hidrataz Aktivitesi Tayini

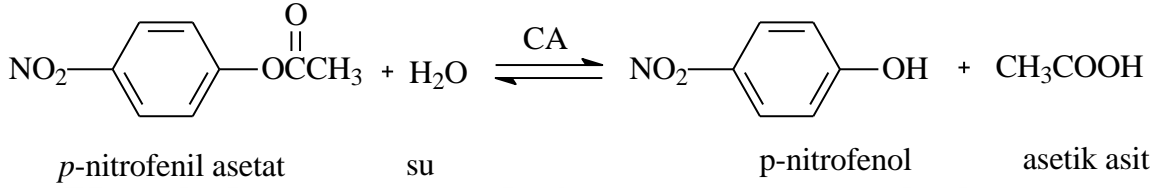
Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi bazı değişiklikler yapılan Wilbur-Anderson yönteminde göre yapıldı. Yöntemin esası ortamda substrat olarak bulunan CO₂'in hidrasyonu sonucu ortaya çıkan H⁺ iyonunun ortamın pH'sını 8.2'den 7.0'a düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır (Wilbur ve Anderson, 1948).

Aktivite ölçümü 0 °C de pH düşüşünün takibiyle potansiyometrik metod ile ölçüldü. Ortamın pH'ının ayarlanmasında HEPES (2.5 mM pH: 8.8) kullanıldı ve substrat çözeltisi olarak da buz banyosunda saf suyun içerisinde 45 dakika süreyle CO₂ geçirilmesiyle elde edilmiş olan doymuş CO₂ çözeltisi kullanıldı. Ayrıca deney sırasında CO₂ konsantrasyonunu doymuş seviyede tutmak için saf su içerisinde CO₂ gazı düşük hızda geçirilmeye devam edildi.

Yönteme göre, numune tüpüne konulan 100 µL eluat üzerine 2.4 mL HEPES (2.5 mM pH: 8.8) ve 2.5 mL % 100 CO₂ gazı ile doyurulmuş saf su ilave edildi ve hızlıca vortekslendi. pH-metrenin elektrodunun çevresi parafilmle iyice sarılıp reaksiyon tüpünün içine gaz kaçağı olmayacak şekilde yerleştirildi ve reaksiyon tüpü buz banyosunun içerisinde tutuldu. CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren bir kronometre yardımıyla pH'ının 8.2'den 7.0'a düşmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_n). Kör olarak hazırlanan tüpe ise enzim yerine 100 µL enzim elüsyon çözeltisi ilave edildi ve yine son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, kronometre yardımıyla pH'ının 8.2'den 7.0'a düşmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (t₀). Tüm ölçümler en az iki paralel çalışıldı ve geçen sürelerin ortalaması alındı. Yönteme göre karbonik anhidraz aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Yani; $EU = (t_0 - t_n) / t_n$ formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı.

2.2.3.2. Esteraz Aktivitesi Tayini

Yöntemin esası, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olmasına dayanmaktadır. Metoda göre, enzim substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil asetatı 348 nm’de absorpsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir (Şekil 23). *p*-nitrofenolün 348 nm’deki molar absorptivite katsayısı (ϵ) $5.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dir (Verpoorte ve Mehta, 1967).



Şekil 23. *p*-nitrofenilasetatın hidroliz reaksiyonu

p-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi de 348 nm’de aynı absorpsiyon göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir ve 348 nm’de *p*-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyona sahip olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır (Armstrong vd, 1966).

Çalışmada kullanılan *p*-nitrofenil asetat (substrat) çözeltisi günlük taze olarak hazırlandı. Substrat çözeltisini esterin sınırlı çözünürlüğünden dolayı 3 mM’ dan daha konsantre hazırlamak mümkün değildir. Ayrıca aseton diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe ettiği için substrat hazırlanmasında kullanılmıştır (Armstrong vd, 1966). pH’sı 7.4 olan 0,05 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi ile enzim çözeltisinin tamponlanması sağlanmıştır.

hCAI, hCAII izoenzimleri ve BCA enzimi saflaştırıldıktan sonra tüplerde toplanan eluatlarda ve diğer inhibisyon çalışmalarında enzim aktivitesi belirlenirken esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. Bunun için 2 mL’lik kuvars küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için eluatların aktivitesine bakılmıştır. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitenin ölçümü için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılma sırası Tablo 6’ya göre uygulandı.

Tablo 6. Esteraz aktivite tayini için pipetleme prosedürü

İlave Edilen Çözeltiler	İlave hacmi (μL)	
	Kontrol	Numune
Tris-SO ₄ tamponu (0,05 M; pH: 7.4)	500	500
Saf su	100	100
Enzim çözeltisi	-	150
Enzim elüsyon tamponu	150	-
3 mM <i>p</i> -nitrofenilasetat	750	750
Toplam hacim	1500	1500

Tablo 6'daki reaksiyon karışımı, günlük hazırlanmış substrat çözeltisi olan *p*-nitrofenil asetat ilavesi ile vortekslendi. Karıştırmayı takiben 15. dakikada 348 nm'de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolattan kaynaklanan absorbans ölçüldü. Kör olarak tamponlanmış enzimin hazırlanmasında kullanılan tampon kullanıldı. Enzimin aktivitesi dışı meydana gelen absorbansı bertaraf etmek için de kontrol olarak enzimsiz deneme yapıldı ve okunan absorbans enzimli ölçülen değerlerden çıkarıldı.

2.2.4. Saflaştırılan Enzim Çözeltisine Diyaliz Uygulanması

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki tampon bileşenlerinin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi uygulandı. Bu işlem için selüloz asetat yapılı, gözenekli ve küçük molekülleri geçiren ancak büyük molekülleri geçirmeyen yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası kullanıldı.

Diyaliz torbasının hazırlanması (aktifleştirilmesinde) işleminde istenen boyutta kesilen diyaliz torbası 1L'lik beher içine yerleştirildi. Daha sonra beher aktifleştirme tamponu (100 mM NaHCO₃-10 mM EDTA pH: 7.4) ilave edilerek 60 °C'de 2 saat boyunca çok yavaş bir şekilde karıştırılır. Bu sürenin sonunda tampon uzaklaştırıldı ve işlem tekrarlandı. Ardından diyaliz torbası saf sudan geçirilip yine 60 °C'de 1 saat düşük hızda karıştırıldı ve sıvı kısım uzaklaştırılıp çözelti berraklaşmaya kadar bu işlem tekrarlandı. Son olarak +4 °C'ye yavaşça soğutulduktan sonra, diyaliz torbası kullanılabilecek kadar % 0.1'lik kloroformda saklandı.

Diyaliz işlemi protein aktivitesindeki kaybı en aza indirebilmek için +4°C'de yapıldı. Diyaliz torbasındaki enzim çözeltisi önce 10 mM EDTA-10 mM PBS içerisinde 12 saat süreyle ve sonra 10 mM PBS içinde 12 saat süreyle diyaliz edildi. Küçük moleküller membrandaki osmotik basınç dengelene kadar serbestçe membrandan geçirildi ve dengeye geldiğinde moleküllerin dış tampona geçmesi durduğu için her 4 saatte bir tampon uzaklaştırıldı ve işlem tekrarlandı. Diyaliz esnasında bazı enzimlerin aktivitesi için gerekli olan koenzimler veya kofaktörler diyalizle ayrılabilir. Bu yüzden ilgili enzim aktivitesi düşük olabilir veya hiç görülmeyebilir. Bu sebeple diyaliz sonrası ilgili enzimin koenzim veya kofaktörü tampona eklenebilir. Diyaliz işlemi biten numuneler liyofilize edildi ve -20 °C de işlem yapılana kadar saklandı.

2.2.5. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografisi ile insan ve hayvan eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimlerinin saflığının kontrolü için SDS-PAGE modifiye Laemmli metoduna göre yapıldı (Laemmli, 1970). SDS-PAGE elektroforezin uygulanması jelin hazırlanışı, örneğin hazırlanışı ve jele uygulanışı ve jelin boyanması aşamalarından oluşmaktadır.

2.2.5.1. SDS- PAGE Jellerinin Hazırlanması

Jel hazırlanmadan önce elektroforez camları kirliliklerin giderilmesi ve jelin sızmamaması için önce say su ile daha sonra etil alkol ile temizlendi. Temizlenen camlar bir peçete ile kurulandı. Ardından uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi. SDS-PAGE, Tablo.7'de oranları verilen % 5'lik yığıma jeli ve % 12'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 7. % 5 ve % 10'luk SDS-PAGE hazırlanışında kullanılan madde miktarları

Bileşenler	% 5'lik Yığıma Jeli	% 10'luk Ayırma Jeli
Saf Su	2.7 mL	4 mL
% 30'luk akrilamid/bisakrilamid	0.67 mL	3.3mL
1.5 M Tris Tamponu (pH: 8.8)	-	2.5 mL
1.0 M Tris Tamponu (pH: 6.8)	0.5 mL	-
% 10'luk Amonyum persülfat	0.04 mL	0.1 mL
SDS (% 10 w/v)	0.04 mL	0.1 mL
TEMED	0.005 mL	0.005 mL

Sisteme öncelikle ayırma jeli yüklendi. Bunun için yukarıda Tablo 7'de verilen kimyasallar sırasına ve miktarına göre 50 mL'lik bir beherde karıştırıldı. % 10'luk ayırma jeline en son TEMED ilave edilerek polimerleşme başlatıldı. Polimerleşmenin başlatılmasıyla birlikte hazırlanan % 10'luk ayırma jeli kısa camın üst kısmından 1 cm aşağısına kadar eklendi. Bu kısma saf su eklenerek hava ile teması kesildi. Daha sonra 40 dakika kadar polimerleşmenin tamamlanması beklendi. Bu sürenin sonunda jelin üzerindeki saf su dökülerek uzaklaştırıldı ve geriye kalan az miktardaki saf su kağıt mendille emdirilerek jelin üzerinden alındı. Daha sonra ayırma jeline benzer şekilde Tablo 7'deki oranlara göre hazırlanan % 5'lik yığıma jeli hızlıca camlar arasında kalan 1 cm'lik boşluğa eklendi. Cam levhaya dökülen yığıma jelinin üzerine kuyucuklar oluşturmak için alkolle dezenfekte edilen tarak dikkatlice yerleştirildi. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.

2.2.5.2. SDS- PAGE Uygulanması

Polimerizasyonun tamamlanmasından sonra camlar tanktaki haznesine dikkatlice yerleştirildi. SDS-PAGE yürütme tamponu (tank tamponu) tank üzerinde belirtilen noktalara kadar dolduruldu. Tanka tampon doldurulduktan sonra tarak kuyucuklara zarar vermeden çıkartıldı. Yürütülecek örneklerin (proteinlerin) üzerine uygun miktarda SDS-PAGE yükleme çözeltisi eklendi. Daha sonra jele uygulanacak olan örnek 10 dakika, standart (markır) 5 dakika termoblok'ta 95 °C'de denatüre olması için bekletildi. Bu şekilde denatüre olan proteinler Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara 20 µL

yüklendi. Jel tamamen tampon içerisinde kalacak şekilde elektroforez küvetine yerleştirildi. Güç kaynağı ile jele 100V 30 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayrışma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi bittikten sonra jel tanktan çıkarıldı ve saf suyla yıkandı. İki cam arasına spatula sokularak camlar birbirinden dikkatlice ayrıldı. Jelin artık kısımları (jelin kenar kısımları, kuyucuklar gibi) spatula ile kesilip atıldı. Daha sonra jel bir kaba alınıp üzerini örtecek kadar jel boyama çözeltisi ilave edilip 10 dakida 70 rpm'de çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya, protein bantları görünür hale gelene kadar boya uzaklaştırma çözeltisi ile 70 rpm'de yıkandı. Jel görüntüleme sistemi ile SDS-PAGE elektroforez sonucu jel üzerinde görünen ilgili enzim belirlendi.

2.2.6. Numunelerin Hazırlanması

2.2.6.1. Çay Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan 2. Nevi Siyah Çay, Antik Yeşil Çay, beyaz çay, çay çöpü ve çay lifi 2016 yılının 1. Sürgün çay numuneleri olarak Rize'de bulunan ÇAYKUR Gündoğdu Çay Fabrikasının'dan, bitkisel çaylar yerel aktar ve marketlerden temin edildi. Ayrıca karşılaştırma yapmak için farklı sürgünlere ait Altınbaş Klasik Siyah Çay, Organik Hemşin Siyah Çay ve Organik Zümrüt Yeşil Çay numuneleri de çay satış noktalarından temin edildi.

Siyah çay, yeşil çay, beyaz çay, çay çöpü, çay lifi ve bitkisel çay numunelerinin hepsi bu bölümle birlikte çay ekstraktları olarak bahsedilecektir. Çalışmada kullanılan sulu çay ekstraktları Tablo 8'de kodları ile birlikte verilmiştir.

Tablo 8. ay ekstraktlarının kodları

ay ekstraktları	Kodları	ay ekstraktları	Kodları
Ihlamur	IHS	2. Nevi Siyah ay	NS
Tarçın	TAS	Altınbaş Klasik Siyah ay	ALS
Adaçayı	ADS	Organik Hemşin Siyah ay	OHS
Kuşburnu	KUS	Antik Yeşil ay	AYS
Ekinezya	EKS	Organik Zümrüt Yeşil ay	OYS
Papatya	PAS	Beyaz ay	BS
Karanfil	KAS	ay Lifi	LS
Nane	NAS	ay çöpü	S

Bitkisel aylar ayrı ayrı metal bir blender yardımıyla öğütüldükten sonra diğ er çay numuneleri ise satışa sunulan haliyle 10'ar gram hassas terazi ile tartıldı. Daha sonra 100 mL saf su kaynatılıp 3-4 dk bekletilerek termometre ile sıcaklık 85 °C'de sabitlendikten sonra tartılan çay ekstraktlarına eklenerek çay demleme işlemi yapıldı. Ekstraksiyon işleminden 15 dakika sonra çay ekstraktları önce 2500 rpm de 30 dakika santrifüj edildi sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından ve ardından gözenek boyutu 0,45 µm'lik şırınga filtresinden geçirildi. Filtreden geçirilen çay ekstraktlarından belirli hacimlerde alınıp evaporatörde çözücülerini uçurularak numunelerin son konsantrasyonları 10 mg/mL olarak ayarlandı. Ihlamur ve tarçın numunelerinde çözünebilirlik ve süzmede karşılaşılan problemlerden dolayı konsantrasyonları 5 mg/mL olarak ayarlandı. Bütün numuneler 2 mL'lik ependorflarda -18 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2.6.2. Gıda Katkı Maddelerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan farklı firmalara ait gıda katkı maddeleri Trabzon Gıda Kontrol Laboratuvarı'ndan temin edildi. Kurkumin, sakkarin ve butil hidroksi toluen (BHT) DMSO'da çözümlenerek hazırlanırken diğ er gıda katkı maddeleri ise saf suda çözümlenerek hazırlandı. Çalışmada kullanılan gıda katkı maddelerinin E kodları, moleköl şekilleri ve moleköl ağırlıkları Tablo 9'da verilmiştir.

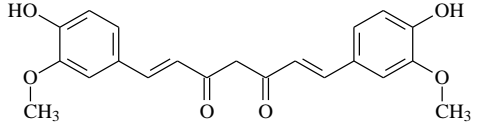
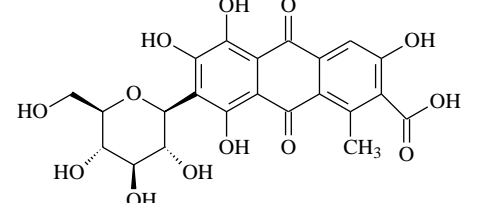
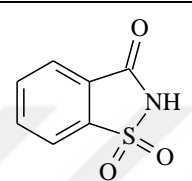
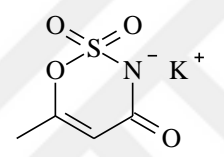
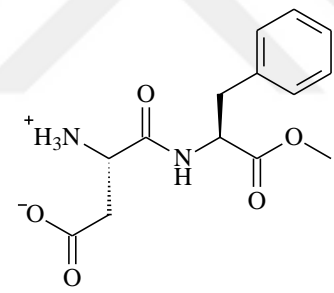
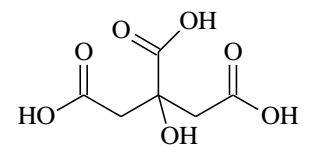
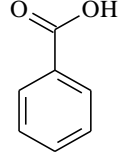
Tablo 9. Çalışmada kullanılan gıda katkı maddelerinin E kodları, molekül şekilleri ve molekül ağırlıkları

No	E Kod	Bileşik Adı	Molekül Şekli	Molekül Ağırlığı (g/mol)
1	E131	Patent Blue V (Food Blue 5, Sulphan Blue)		1159.45
2	E129	Allura Red AC		496.43
3	E102	Tartrazin		534.35
4	E124	Ponceau 4R		604.46
5	E110	Sunset Yellow FCF		452.36

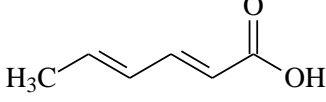
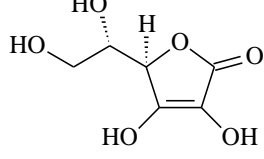
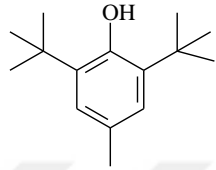
Tablo 9'un devamı

6	E133	Brilliant FCF	Blue		792.84
7	E151	Brilliant BN	Black		867.69
8	E127	Eritrosin B			879.87
9	E123	Amarant			604.48
10	E132	İndigo karmin			466.36

Tablo 9'un devamı

11	E100	Kurkumin (Natural Yellow 3, turmerik yellow)		368.37
12	E120	Karminik asit		492.39
13	E954	Sakkarin		183.18
24	E950	Asesülfam K		201.242
15	E951	Aspartam		294.301
16	E330	Sitrik asit		192.12
17	E210	Benzoik Asit		122.12

Tablo 9'un devamı

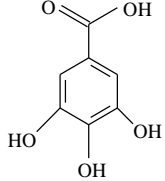
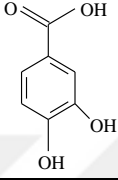
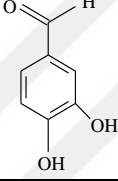
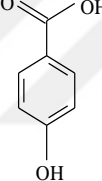
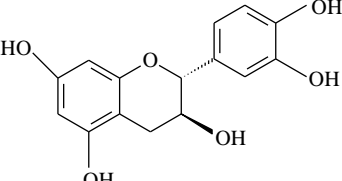
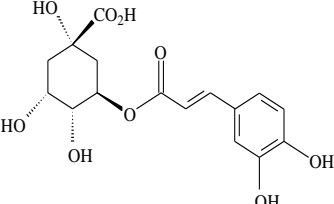
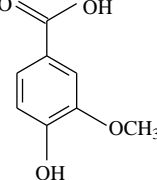
18	E200	Sorbik asit		112.13
19	E300	Askorbik asit		176.12
20	E321	Butil hidroksi toluen (BHT)		220.36

2.2.7. Çay Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV Cihazı ile Fenolik Bileşen Analizi

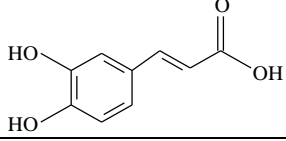
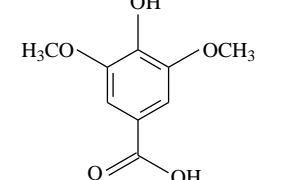
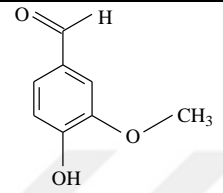
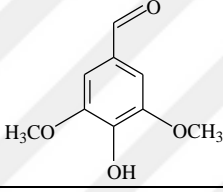
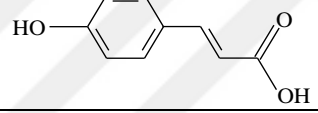
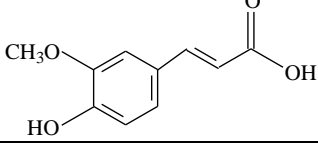
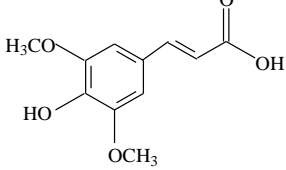
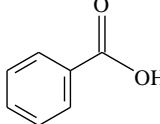
2.2.7.1. Kromatografik Analiz İçin Standartların Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında çay ekstraktlarında HPLC-DAD-UV kullanılarak fenolik bileşen analizi yapılmıştır. Bunun için literatürde yaygın olarak kullanılan fenolik standartların yanı sıra laboratuarda bulunan fenolik standartlar kullanılmıştır. Kullanılan 15 standart molekül şekilleri, molekül ağırlıkları ve maksimum dalga boyları ile Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. HPLC analizinde kullanılan fenolik standartların yapısı

No	Standardın adı	Standardın molekül şekli	Standardın molekül ağırlığı (g/mol)	DAD'da maksimum dalga boyu (nm)
1	Gallik asit		170.12	274
2	Protokatekuik asit		154.12	260
3	Protokatekualdehit		138.12	280
4	<i>p</i> -OH Benzoik asit		138.12	260
5	Kateşin		290.27	274
6	Klorojenik asit		168.15	324
7	Vanilik asit		354.17	260

Tablo 10'nun devamı

8	Kafeik asit		180.10	324
9	Siringik asit		198.17	274
10	Vanilin		152.15	280
11	Siringaldehit		182.18	308
12	<i>p</i> -Kumarik asit		164.16	308
13	Ferulik asit		194.19	324
14	Sinapik asit		224.21	324
15	Benzoik asit		122.12	240

2.2.7.2. Standartların ve Numunelerin Hazırlanması

Tablo 10'da verilen her bir standardın 10 mM 2 mL'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bütün standartların çözücüsü % 40'lık metanol-ultra saf su olup, standartların tartılan miktarı önce metanolde çözüldü daha sonra ultra saf su ile istenilen hacme tamamlandı.

Son konsantrasyonları 5 ve 10 mg/mL olan çay ekstraktları, kromatografik analiz için öncelikle 0,45 µm por büyüklüğüne sahip tek kullanımlık şırınga filtreden geçirildi ve 20 µL enjeksiyon yapılarak optimize edilen metot (Tablo 11) ile HPLC-DAD-UV'de yürütüldü.

2.2.7.3. HPLC-DAD-UV Koşulları ve Standartların Kalibrasyonu

Bütün HPLC-DAD-UV analizleri Agilent (Waldbronn, Almanya)'in 1100 serisine ait 3'lü çözücü pompası, gaz gidericisi (degasser) ve ultra viyole dedektörü (UV) ile 1200 serisine ait diyot serili dedektörü (DAD) kullanılarak yapıldı. Cihaz Chem Station programı ile (Agilent) kontrol edildi. Tüm analizlerde bir Ace 5 C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül; UK) ve Hamilton şırınga (25 µL) kullanıldı. Hareketli faz A: % 0,5 asetik asit içinde % 50-50 asetonitril-ultra saf su, B: % 100 HPLC gradient kalitesinde asetonitril ve C: % 2'lik asetik asit-ultra saf su çözeltisinden oluşmaktadır. Hareketli faz çözücü sisteminde pH'yı düşürmek ve kullanılan standartları yüksüzleştirmek amacıyla asetik asit kullanıldı. Elüsyonda takip eden gradient Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Standartların ve çay ekstraktlarındaki fenolik bileşenlerin ayrılmasında kullanılan hareketli faz gradient programı

No	Zaman (dk)	% A çözücüsü	% B çözücüsü	% C çözücüsü	Akış hızı (mL/dk)	Maksimum Basınç (bar)
1	0.00	10.0	0	90.0	0.700	275
2	10.00	15.0	0	85.0	0.700	275
3	35.00	50.0	0	50.0	0.700	275
4	37.00	90.0	0	10.0	0.700	275
5	39.00	20.0	80.0	0	0.700	275
6	43.00	20.0	80.0	0	0.700	275
7	44.00	10.0	0	90.0	0.700	275
8	45.00	10.0	0	90.0	0.700	275

Enjeksiyon hacmi 20 µL ve akış hızı 0.7 mL/dk idi. Kolon sıcaklığı 25 °C'ye ayarlandı. UV dedektörü 280 nm'de, DAD dedektörü ise 8 farklı dalga boyunda (240, 254, 260, 274, 280, 308, 324, 348 nm) çalıştırıldı. DAD'da belirlenen dalga boyları, literatürde

fenolik standartların spektrumları incelenerek maksimum absorpsiyon dalga boyları arasından seçilmiştir.

10 mM'lık stok çözeltileri hazırlanan 15 fenolik standart belirli oranlarda % 40'lık metanol ile seyreltilerek bunların 500, 350, 200, 100 ve 50 µM'lık çözeltileri hazırlandı ve Tablo 10'daki hareketli faz gradienti programı kullanılarak HPLC-UV-DAD'da tek tek yürütüldü. Daha sonra bu standartların, çözeltide her biri 500, 350, 200, 100 ve 50 µM olacak şekilde karışımları hazırlandı ve aynı program ile HPLC-UV-DAD sisteminde yürütüldü.

Standartlara ait kalibrasyon grafiklerini çizebilmek için, her bir standardın 500, 350, 200, 100 ve 50 µM'lık konsantrasyonda çözeltileri hazırlanıp HPLC'de tek tek yürütülerek her bir pike karşılık gelen pik alanları belirlendi. Konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları grafiğe geçirildiğinde ise her bir standarda ait kalibrasyon grafikleri elde edildi. Aynı zamanda her bir standarda ait konsantrasyon pik yüksekliği verileri de grafiğe dönüştürüldü.

2.2.7.4. Çay Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV Analizleri

Saf su ile hazırlanan bütün çay ekstraktları 0.45 µm'lik filtrelerden geçirilerek 20 µL'si Hamilton şırınga ile HPLC sistemine enjekte edildi. Enjekte edilen ıhlamur ve tarçın ekstraktlarının konsantrasyonları 5 mg/mL iken diğer çay ekstraktlarının konsantrasyonu ise 10 mg/mL'dir. Tüm yürütmeler geliştirilen gradient programı ile en az iki paralel olacak şekilde yapıldı. DAD ile sekiz farklı dalga boyunda (240, 254, 260, 274, 280, 308, 324, 348 nm) pik analizleri yapılırken UV dedektörü ile de fenolik bileşenler için maksimum dalgaboyu olan 280 nm'de analiz yapıldı.

2.2.8. HPLC-DAD-UV Cihazı ile Kateşinler, Kafein ve Gallik Asit Analizi

HPLC-DAD-UV ile siyah, beyaz, yeşil çay, çay çöpü ve çay lifi ekstraktlarında, çayda bulunan kateşinler, kafein ve gallik asit analizi yapıldı. Çalışmada kullanılan A, B, C standart kateşin karışımları Rize Çay Enstitüsü'den temin edildi.

2.2.8.1. Kromatografik Analiz İçin Standartların Hazırlanması

HPLC-DAD-UV ile çay kateşinlerinin analizinde kullanılan standart maddeler Tablo 12’ de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 12. Kullanılan kateşinler, kafein ve gallik asit standartlarının hazırlanması

Standart Madde	Kullanılan Çözücü	Stok Çözelti Konsantrasyonu (ppm)
Gallik asit	Ultra saf su	1 mg/mL =1000 ppm
Kafein	Ultra saf su	2 mg/mL=2000 ppm
(+)-kateşin (C)	Stabilize Çözeltisi	1 mg/mL=1000 ppm
(-)-epikateşin (EC)	Stabilize Çözeltisi	1 mg/mL=1000 ppm
(-)-epigallokateşin (EGC)	Stabilize Çözeltisi	2 mg/mL=2000 ppm
(-)-epigallokateşin gallat (EGCG)	Stabilize Çözeltisi	2 mg/mL=2000 ppm
(-)-epikateşin gallat (ECG)	Stabilize Çözeltisi	2 mg/mL=2000 ppm

Kateşinler, kafein ve gallik asit standartlarının hazırlanmasında kullanılan stabilize çözeltisi, 500 ppm EDTA ve 500 ppm L-askorbik asit içeren % 10’luk (v/v) asetonitril çözeltisinden oluşmaktadır. İçerisindeki L-askorbik asit fenolik bileşiklerin oksidasyonunu önler. EDTA ise ortamdaki metal iyonlarını tutar. Fenolik bileşikler stabilize çözelti içerisinde analiz süresince daha stabil bir şekilde kalırlar. Çözelti günlük taze olarak hazırlanmalıdır.

Tablo 12’de verildiği şekilde hazırlanan stok standart çözeltileri kullanılarak 3 farklı (A, B, C) standart çözelti karışımı hazırlanır (Tablo 13). Hazırlanan bu standart çözelti karışımları cihaza verilerek bir kalibrasyon eğrisi elde edildi.

Tablo 13. Standart karışım çözeltilerin hazırlanması A, B ve C

Stok Standart	Karışımındaki Standart Konsantrasyonları (ppm)		
	A	B	C
Gallik asit	5	10	25
Kafein	50	100	150
(+)-C	50	100	150
EC	50	100	150
EGC	100	200	300
EGCG	100	200	400
ECG	50	100	200

2.2.8.2. HPLC-DAD-UV Koşulları ve Standartların Kalibrasyonu

Bütün çay kateşinlerinin analizinde fenolik standartların analizinde kullanılan HPLC-DAD-UV cihazı kullanıldı.

Hareketli faz A: % 9 ACN, % 2 asetik asit, 2 mL EDTA (20 ppm) ve B: % 80 ACN, % 2 asetik asit, 1 mL EDTA (20 ppm) çözeltisinden oluşmaktadır. Mobil faz çözeltileri günlük taze olarak hazırlandı. Hazırlanan mobil fazlar 0.45 µm membran filtreden süzülerek mobil faz şişesine aktarıldı. Enjeksiyon hacmi 10 µL ve akış hızı 1 mL/dk idi. Kolon sıcaklığı 35 °C'ye ayarlandı. UV ve DAD dedektörü 278 nm'de çalıştırıldı. Elüsyonda takip eden gradient Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 14. Kateşinler, kafein ve gallik asit standartların ayrılmasında kullanılan hareketli faz gradient programı

	Zaman (dk)	% A çözücüsü	% B çözücüsü	Akış hızı (mL/dk)	Maksimum Basınç (bar)
1	0.00	100	00.0	1.000	275
2	10.00	100	00.0	1.000	275
3	25.00	68.0	32.0	1.000	275
4	35.00	68.0	32.0	1.000	275
5	45.00	100	0	1.000	275

Analiz için önce A standart karışımı, sonra B ve C standart karışımları enjekte edildi. Elde edilen kromatogramlardan faydalanarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Düzgün bir kalibrasyon eğrisi elde edildikten sonra örneklerin enjeksiyonuna başlandı. Numunelerde hata oranını azaltmak için 2 paralel çalışıldı. Enjekte edilen numuneye ait kromatogram çıktısından standartlara ait kromatogramdaki aynı tutulma zamanına sahip piklerin alanlarına bakılarak sonuç hesaplaması yapıldı.

2.2.9. Gıda Katkı Maddelerinin, Fenolik Bileşiklerin ve Çay Ekstraktlarının Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi

2.2.9.1. Gıda Katkı Maddelerinin, Fenolik Bileşiklerin ve Çay Ekstraktlarının Karbonik Anhidraz Enzimi Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri

20 tane gıda katkı maddesi, 13 fenolik bileşik ve 16 sulu çay ekstraktlarının karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyonuna esteraz aktivite tayin metoduyla bakılmıştır. Bunun için saflaştırılan hCA I, hCA II, BCA izoenzimleri ve inhibitör aktivitesi karşılaştırması amacıyla sülfanilamid ve asetazolamid standart inhibitörleri kullanılmıştır. Esteraz aktivite testinde Tablo 15'deki pipetleme prosedürü kullanıldı. Substrat çözeltisi eklenip vortekslendikten sonra karışımın 348 nm'deki absorbansı 30 dakika boyunca kaydedildi ve sonuçlar numune içermeyen kontrol ve enzim içermeyen kör testlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Körlerin çıkarılmasıyla elde edilen sonuçlar kontrol testine göre % inhibisyon olarak belirlendi ve %İnhibisyon hesabı aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\%İnhibisyon = \frac{Aktivite_{Kontrol} - Aktivite_{Numune}}{Aktivite_{Kontrol}} \times 100$$

Tablo 15. Gıda katkı maddelerinin, fenolik bileşiklerin ve çay ekstraktlarının karbonik anhidraz enziminin esterez aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesinde kullanılan pipetleme prosedürü

İlave Edilen Çözeltiler	Numune (µL)	Numune (µL)	Körü	Kontrol (µL)	Kontrol Körü (µL)
Tris-SO ₄ tamponu (0,05 M; pH: 7.4)	550	550		550	550
Enzim çözeltisi	150	-		150	-
Saf su	-	150		-	150
İnhibitör	50	50		-	-
İnhibitör çözücüsü	-	-		50	50
3 mM <i>p</i> -nitrofenilasetat	750	750		750	750
Toplam hacim	1500	1500		1500	1500

2.2.9.2. Numuneler İçin % İnhibisyon, IC₅₀ ve Ki Değerlerinin Belirlenmesi

Doygun substrat konsantrasyonunda bütün numunelerin BCA, hCAI ve hCAII izoenzimlerinin esterez aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için farklı inhibitör konsantrasyonunda ölçümleri yapılarak Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerdeki eğrinin denkleminde %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplandı. Ayrıca bütün numunelerin 2 mg/mL (son konsantrasyon 0.067 mg/mL)' de göstermiş oldukları inhibisyon değerleri kullanılarak % inhibisyon değerleri bulundu.

Ki değerlerini belirlemek için insan eritrositlerinden saflaştırılan hCAI izoenziminin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit inhibitör konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Bu deneylerde substrat olarak 4-nitrofenilasetatın beş farklı konsantrasyonu (0.15-0.30-0.45-0.60-0.75 mM) kullanıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarı yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon için $V_{maks} = V^I_{maks}(1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak Ki değerleri hesaplandı.

3. BULGULAR

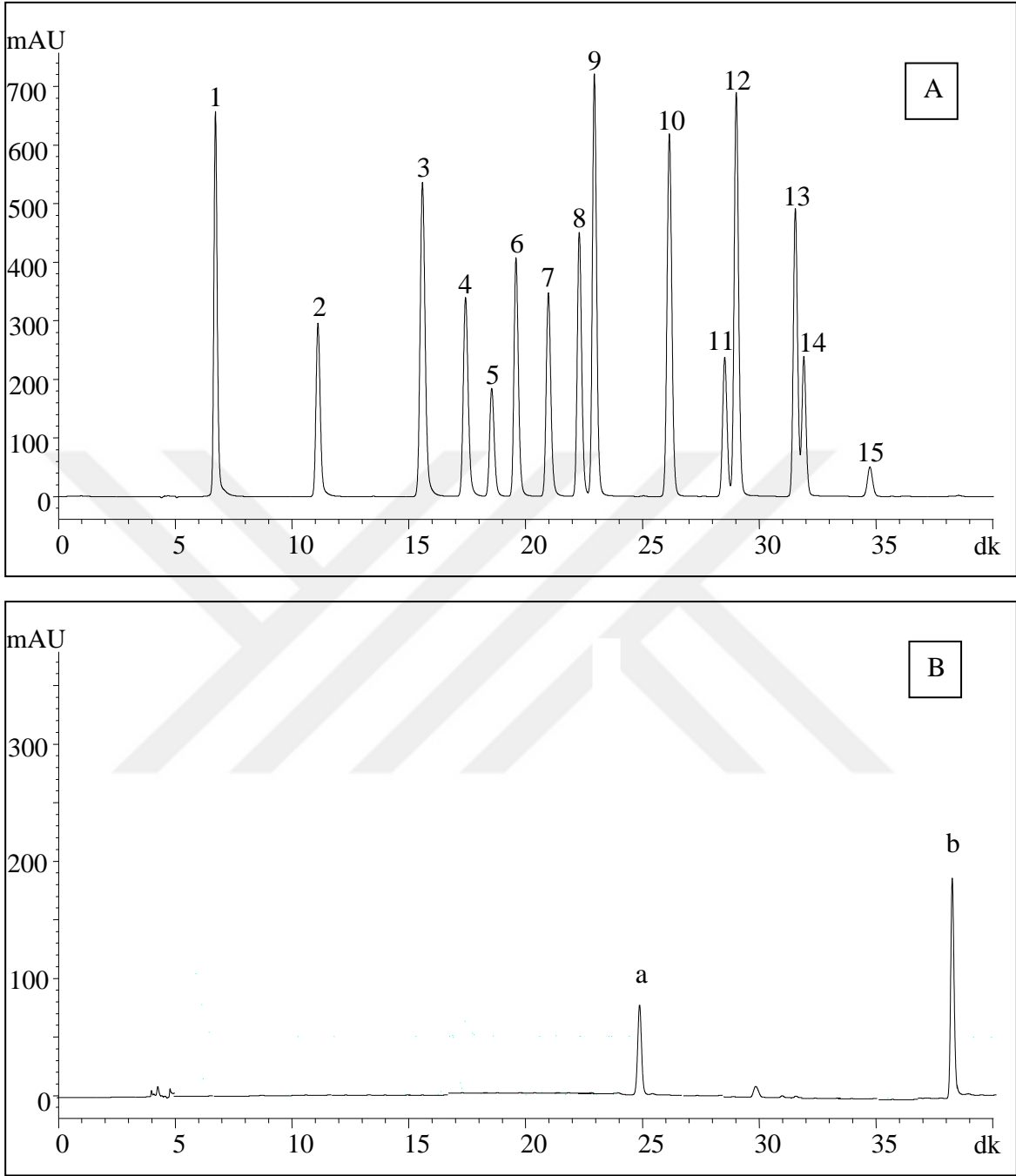
3.1. ay Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV ile Fenolik Bileşen Analizi

3.1.1. Fenolik Standartların HPLC-DAD-UV ile Analizi İçin Metot Geliştirme

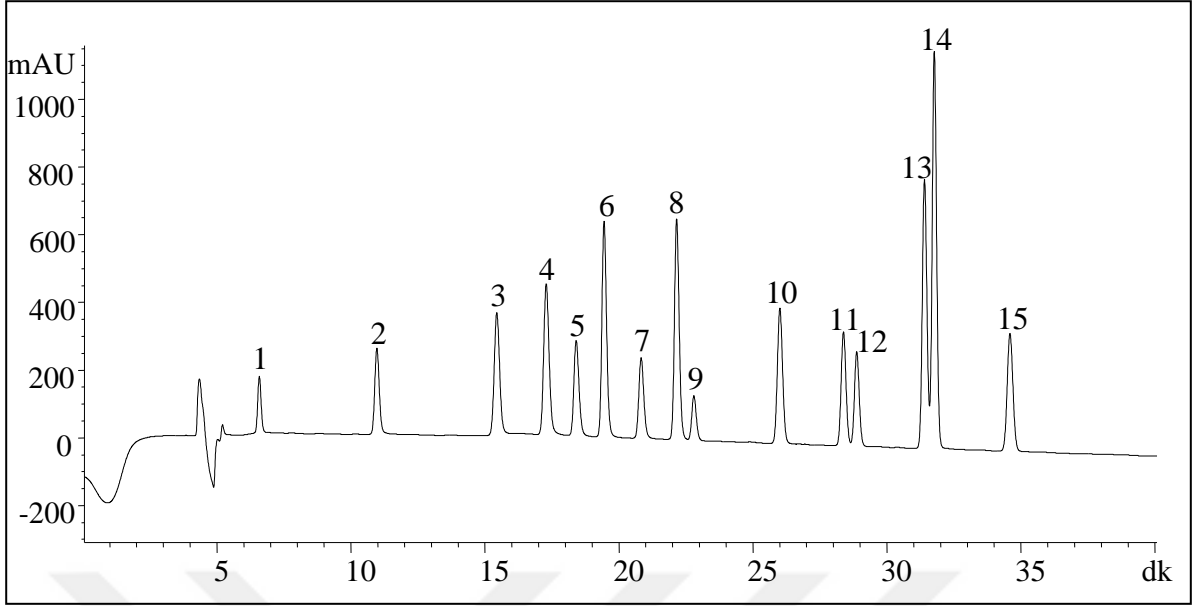
15 fenolik standardın (gallik asit, protokatekuik asit, protokatekualdehit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, vanilin, siringaldehit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, benzoik asit) 500 µM karışımlarının yürütülmesiyle elde edilen UV (280 nm) ve DAD (240, 254, 260, 274, 280, 308, 324 ve 348 nm) kromatogramları Şekil 24-32’de verilmiştir. 45 dakikada 15 fenolik standart birbirinden ayrılmıştır. Kromatogramlarda yer alan 15 fenolik standardın alıkonma zamanları (RT: retention time) Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 16. HPLC’de yürütölen 15 fenolik standardın UV-280 nm’deki tutulma zamanları

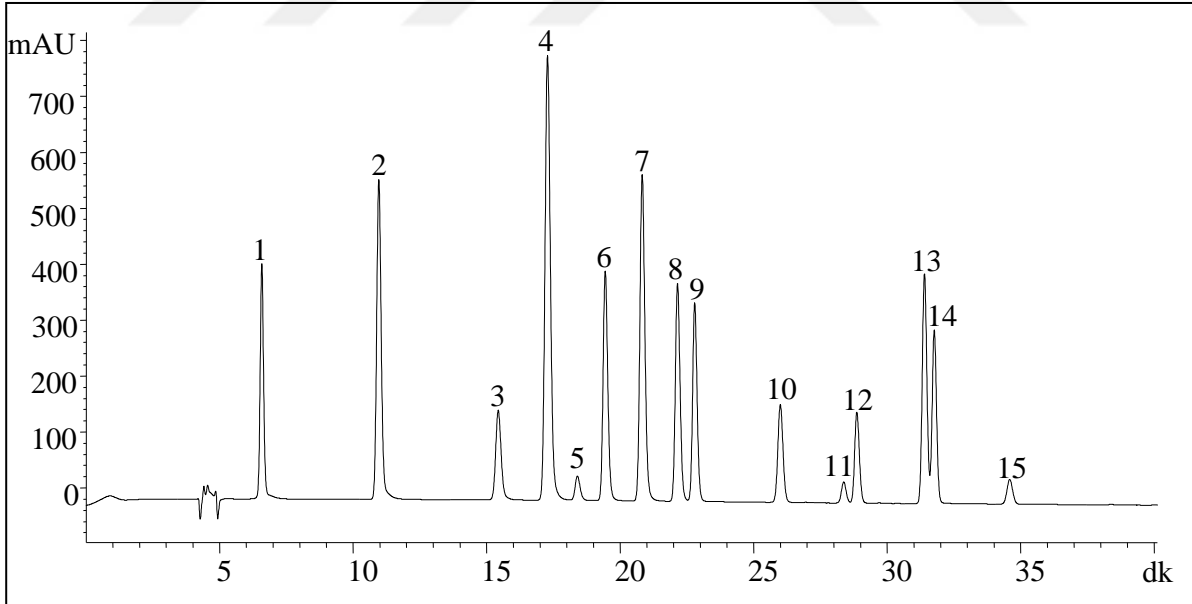
No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı (dk)	Standart Sapma
1	Gallik asit	6,718	0,006
2	Protokatekuik asit	11,107	0,032
3	Protokatekualdehit	15,575	0,049
4	<i>p</i> -OH benzoik asit	17,418	0,062
5	Kateşin	18,530	0,036
6	Klorojenik asit	19,569	0,015
7	Vanilik asit	20,948	0,055
8	Kafeik asit	22,283	0,056
9	Siringik asit	22,930	0,036
10	Vanilin	26,128	0,040
11	Siringaldehit	28,505	0,034
12	<i>p</i> -Kumarik asit	28,983	0,062
13	Ferulik asit	31,523	0,049
14	Sinapik asit	31,894	0,042
15	Benzoik asit	34,712	0,059



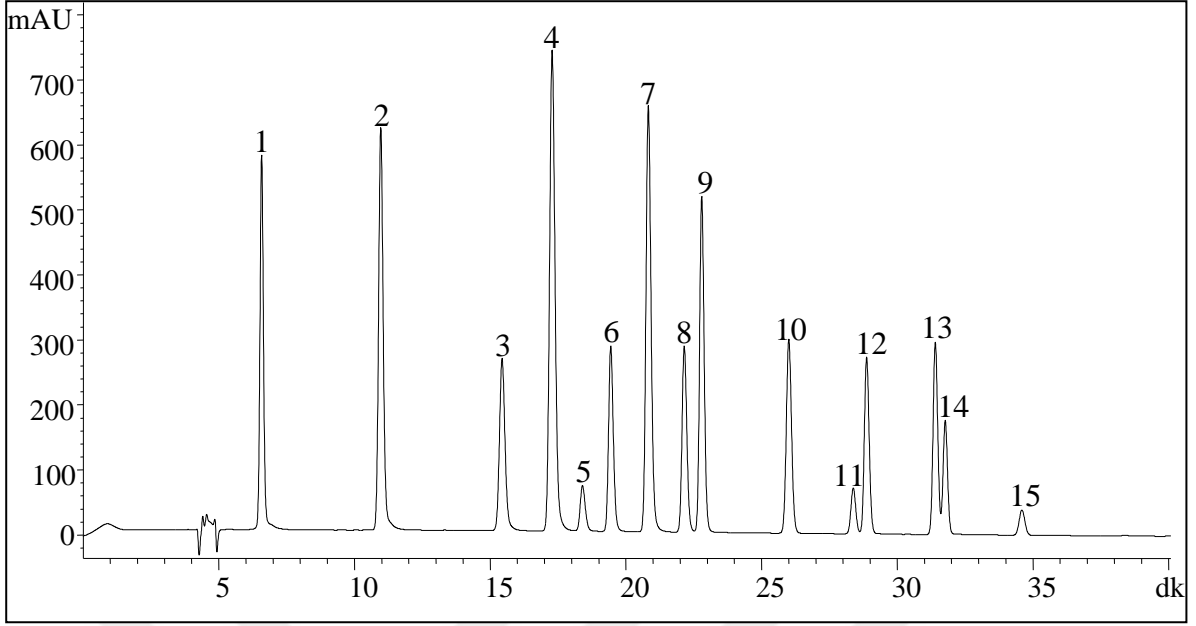
Şekil 24. Standart fenolik bileşiklerin 500 μM 'lık karışımının 280 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı A: (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit), B: a: epikateşin, b: rozmarinik asit



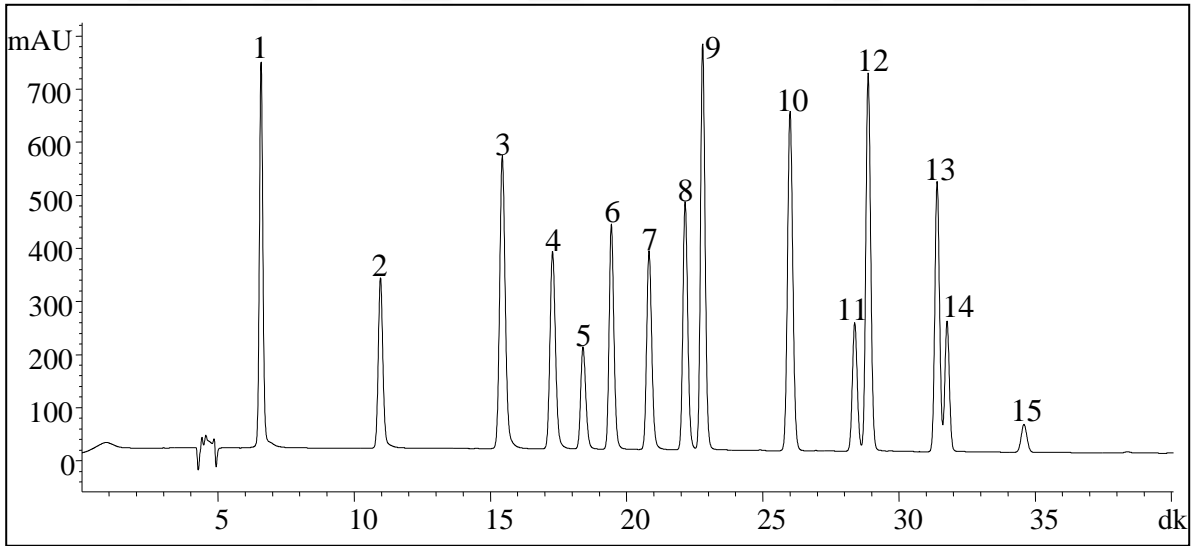
Şekil 25. Standart fenolik bileşiklerin 500 μ M'lık karışımının 240 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit)



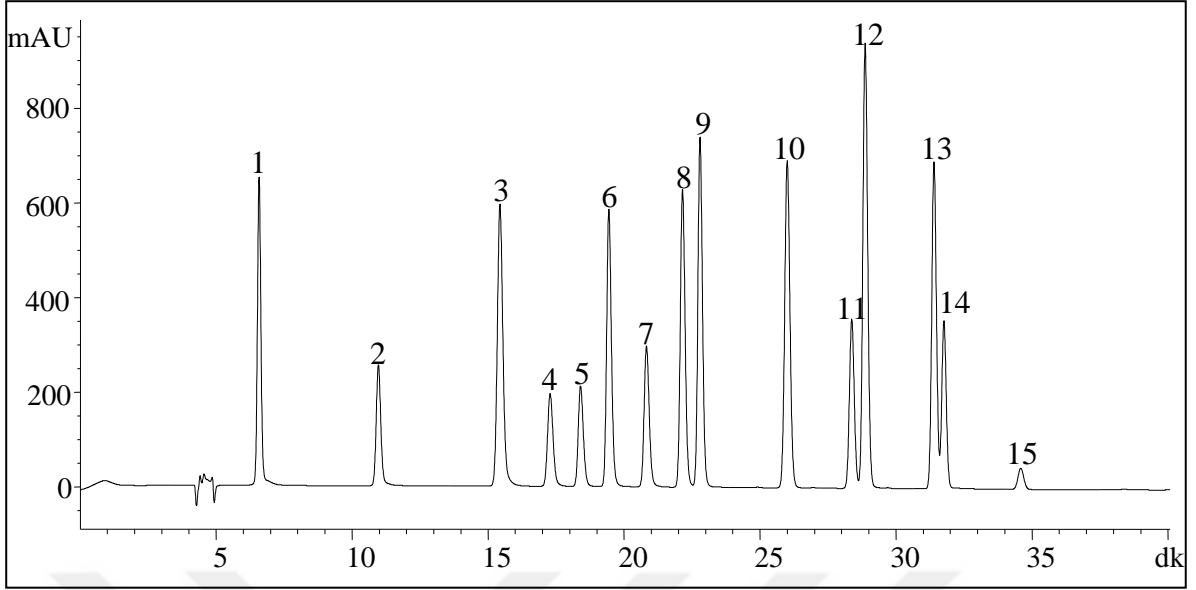
Şekil 26. Standart fenolik bileşiklerin 500 μ M'lık karışımının 254 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit)



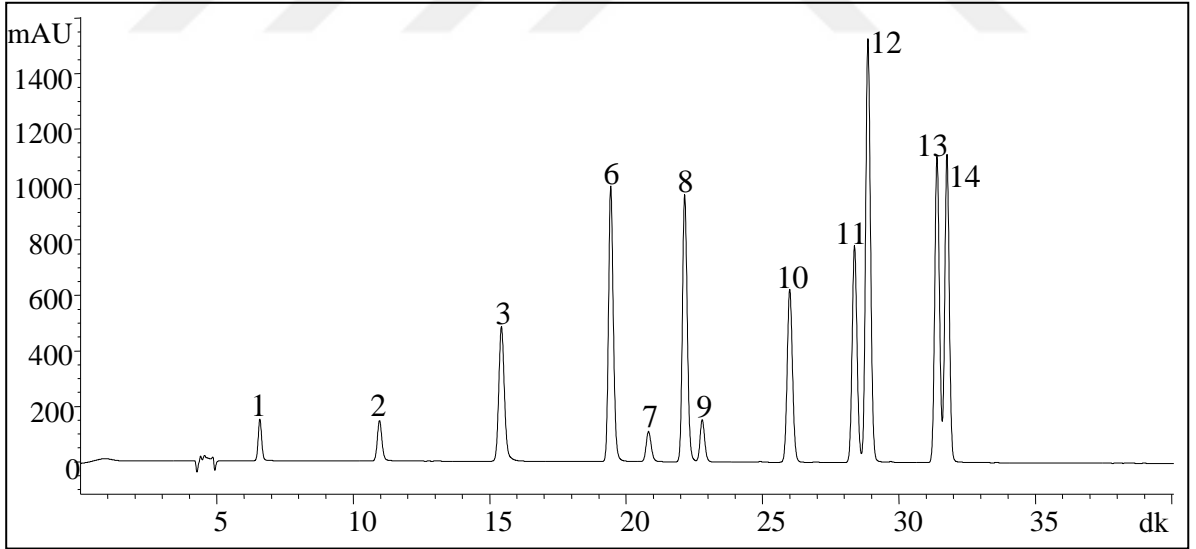
Şekil 27. Standart fenolik bileşiklerin 500 μ M'lık karışımının 260 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit)



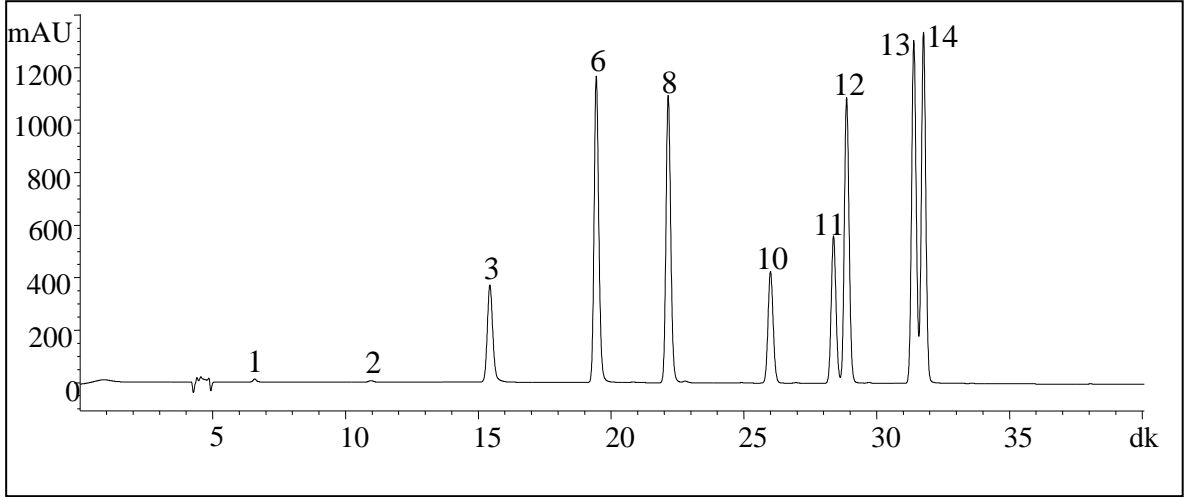
Şekil 28. Standart fenolik bileşiklerin 500 μ M'lık karışımının 274 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit)



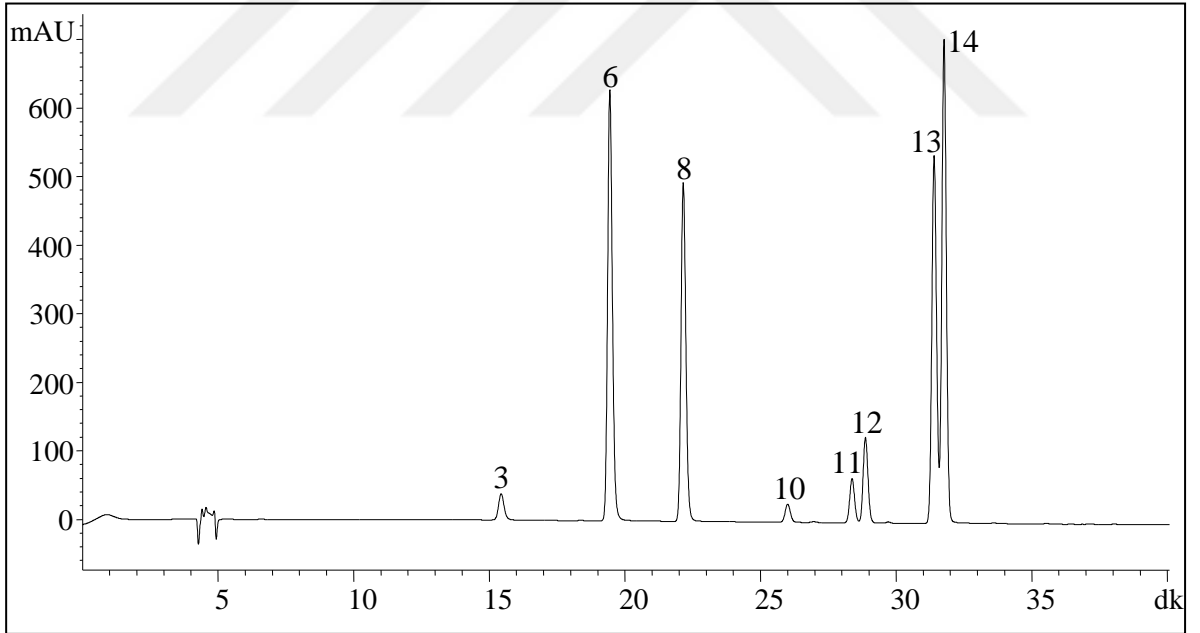
Şekil 29. Standart fenolik bileşiklerin 500 μ M'lık karışımının 280 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit)



Şekil 30. Standart fenolik bileşiklerin 500 μ M'lık karışımının 308 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit)



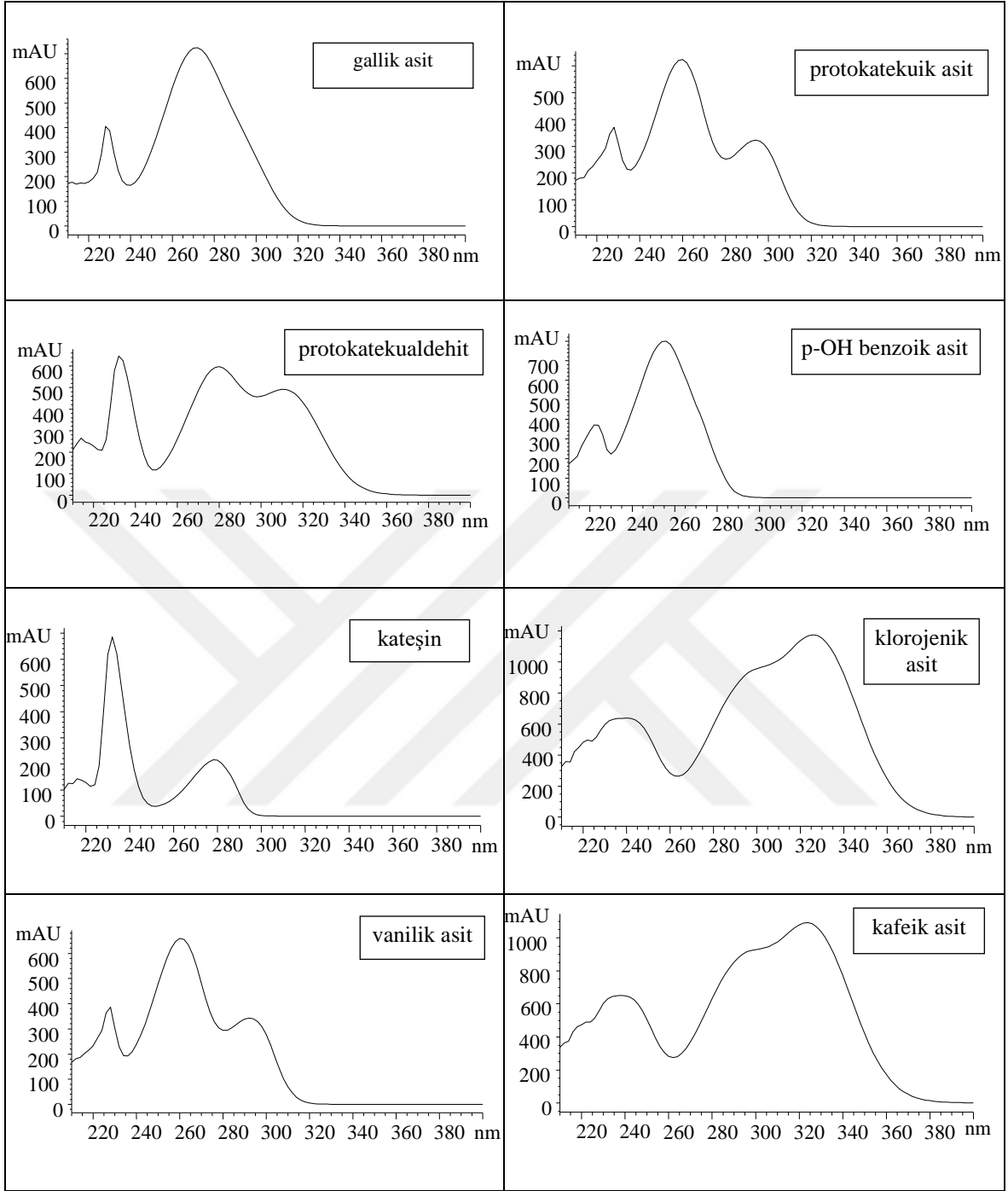
Şekil 31. Standart fenolik bileşiklerin 500 μ M'lık karışımının 324 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit)



Şekil 32. Standart fenolik bileşiklerin 500 μ M'lık karışımının 348 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. protokatekuik asit, 3. protokatekualdehit, 4. *p*-OH benzoik asit, 5. kateşin, 6. klorojenik asit, 7. vanilik asit, 8. kafeik asit, 9. siringik asit, 10. vanilin, 11. siringaldehit, 12. *p*-kumarik asit, 13. ferulik asit, 14. sinapik asit, 15. benzoik asit)

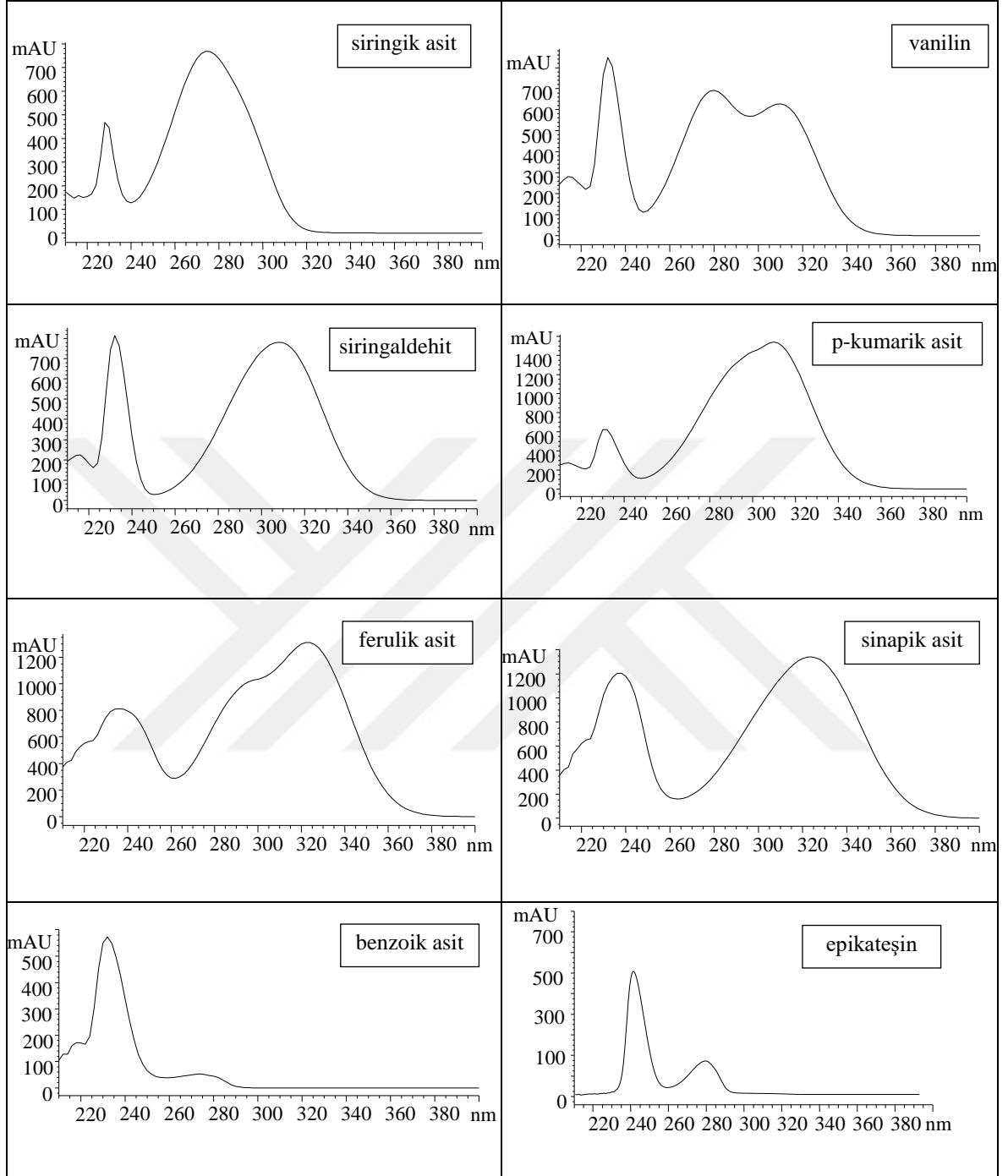
Çay ekstraktlarındaki fenolik bileşenlerin tanımlanması, bileşiklerin tutulma zamanları ve DAD spektrumlarının ilgili standart maddelere ait süre ve spektrumlarla karşılaştırılması ile yapılmıştır. Deneysel çalışmalar süresince kullanılan 15 fenolik standarda ait DAD spektrumları Şekil 33’de verilmiştir.

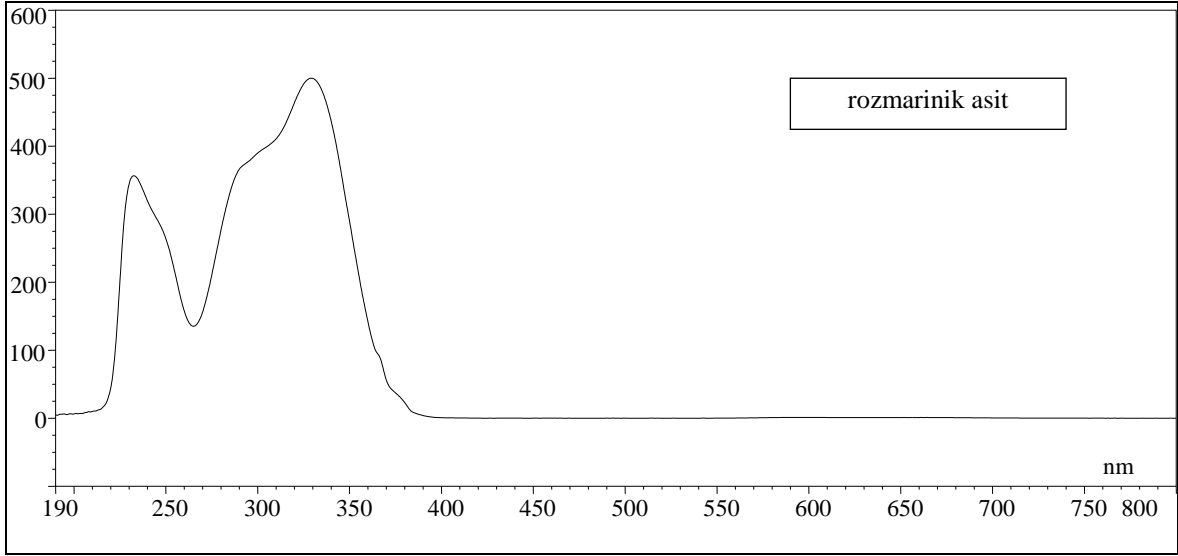




Şekil 33. Analizlerde kullanılan 15 fenolik standardın DAD-spektrumları

Şekil 33'ün devamı

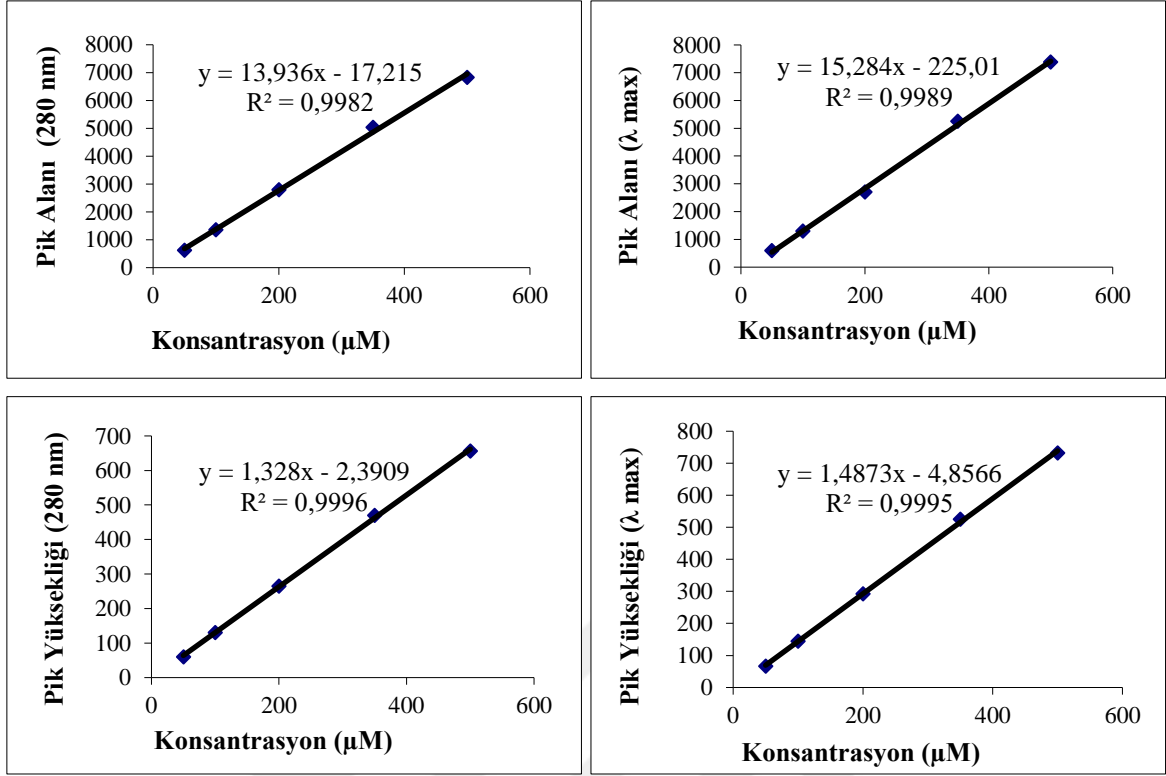




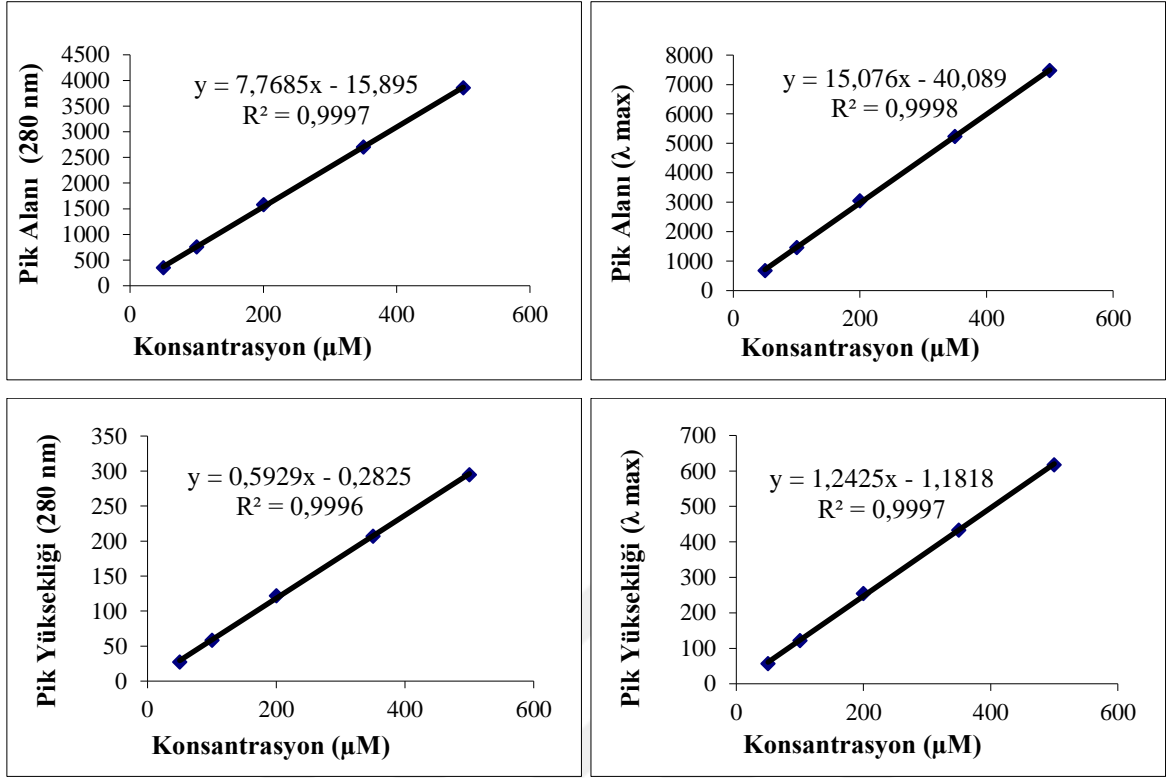
3.1.2. Fenolik Standartların Kalibrasyon Eğrileri

15 fenolik standardın (gallik asit, protokatekuik asit, protokatekualdehit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, vanilin, siringaldehit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, benzoik asit) beş farklı konsantrasyonda (50, 100, 200, 350, 500 μ M) yürütülmesiyle her biri için UV 280 nm’de ve maksimum absorpsiyon dalga boyunda elde edilen kromatogramlardaki pik alanları ve pik yükseklikleri konsantrasyona karşı Microsoft Excel programında grafiğe geçirildi (Şekil 34-48). Bu grafikler, kullanılan on beş standardın test edilen 50-500 μ M konsantrasyonu aralığındaki doğrusallığını ortaya koymak için hazırlanmıştır. Epikateşin ve rosmarinik asit standartları çalışmaya sonradan dahil edilmiş olup, kalibrasyon grafikleri çizilmemiştir. Bu iki standart kalitatif tayin amaçlı kullanılmıştır.

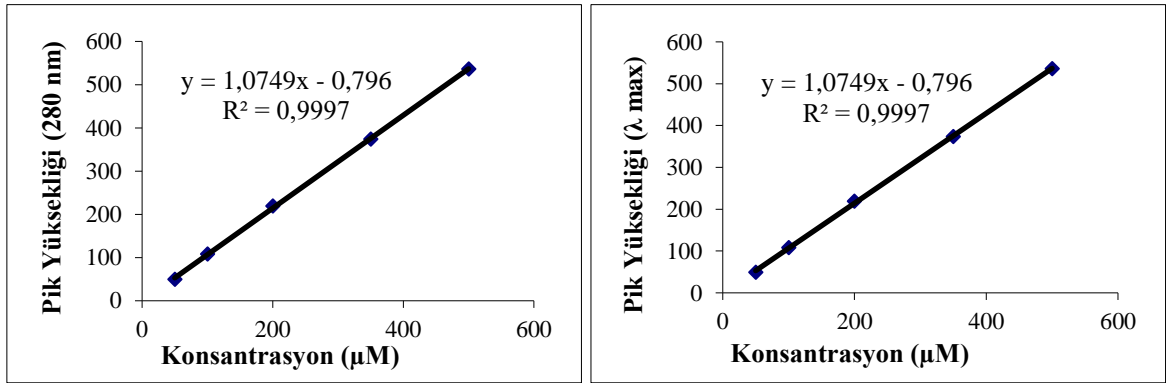
Ayrıca kantitatif analizde çay ekstraktlarındaki bileşiklere ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş entegre alanlar ve standart maddelerin ara stok çözeltileri ile hazırlanmış bu kalibrasyon grafiklerinden yararlanılmıştır.



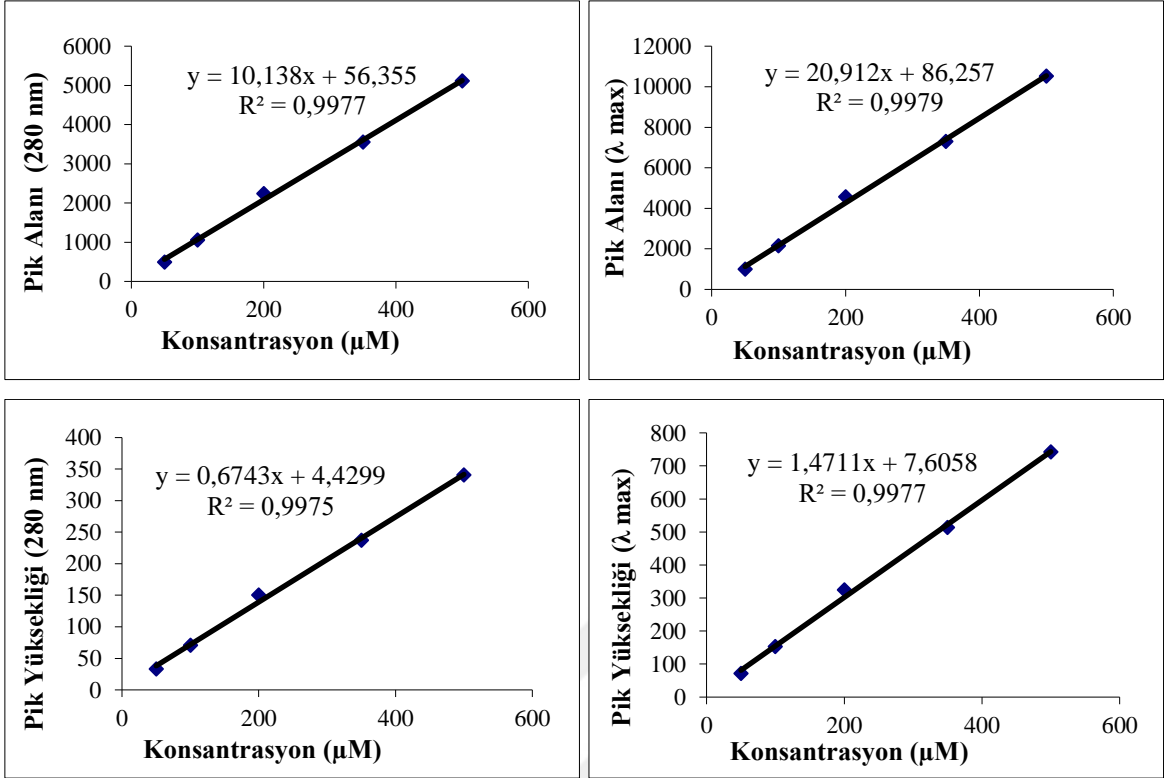
Şekil 34. Gallik asitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (274 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



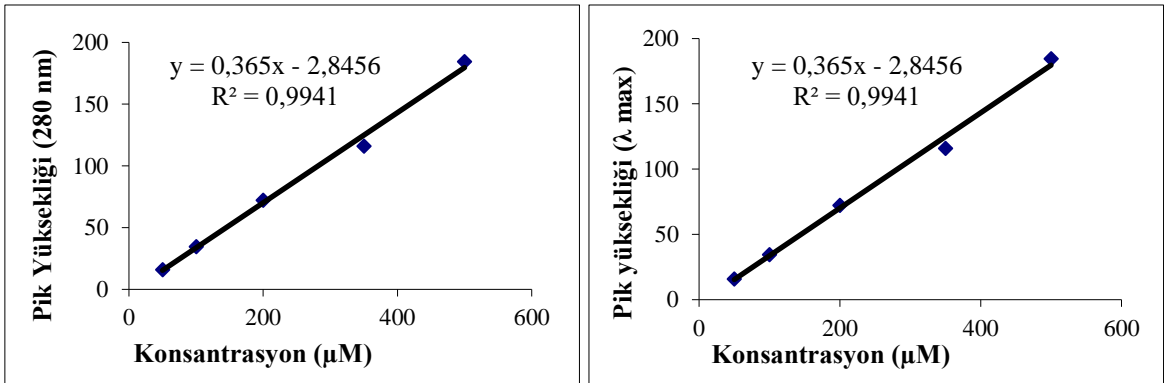
Şekil 35. Protokatekuik asitin 280 nm ve $\lambda_{\text{maks.}}$ (260 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



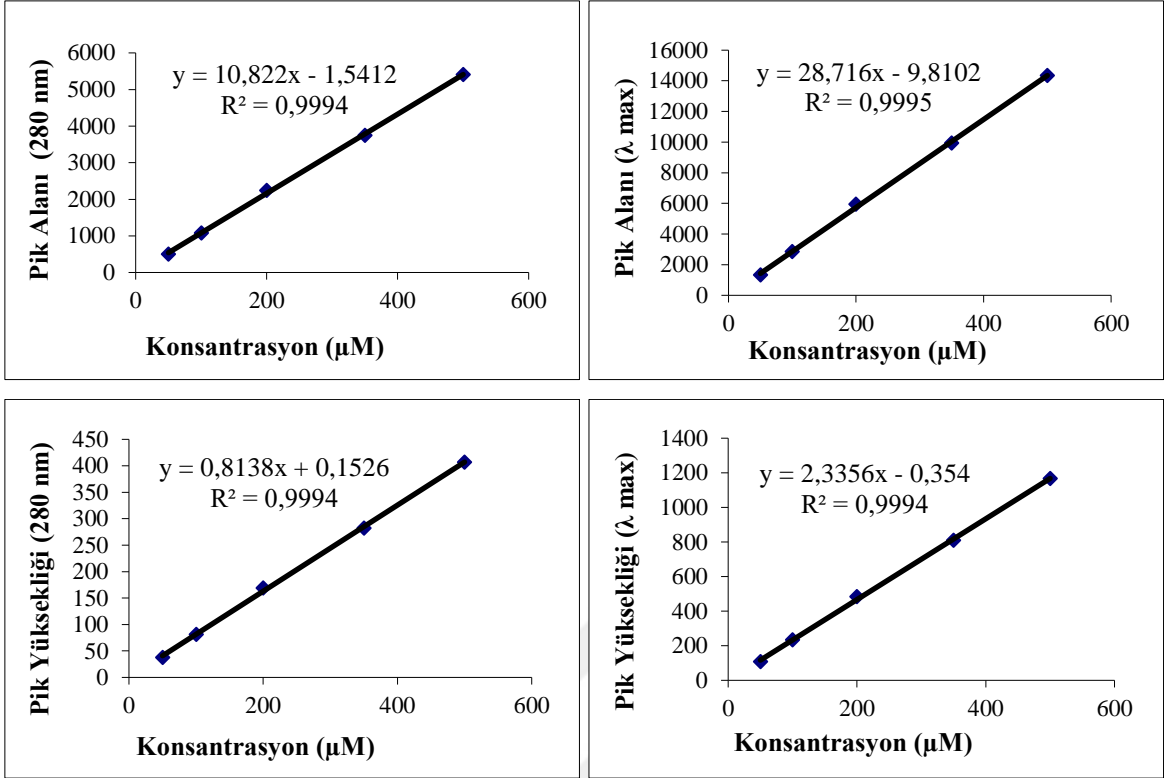
Şekil 36. Protokatekualdehitin 280 nm ($\lambda_{\text{maks.}}$)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



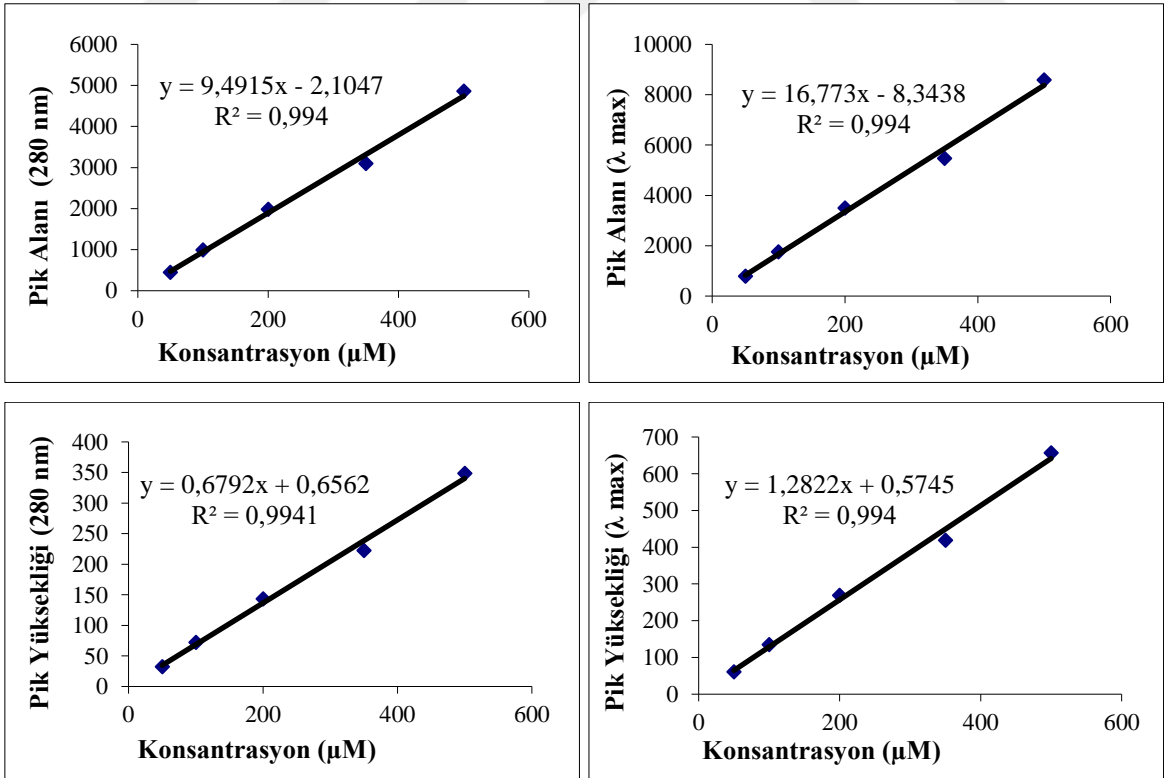
Şekil 37. *p*-OH benzoik asitin 280 nm ve $\lambda_{\text{maks.}}$ (260 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



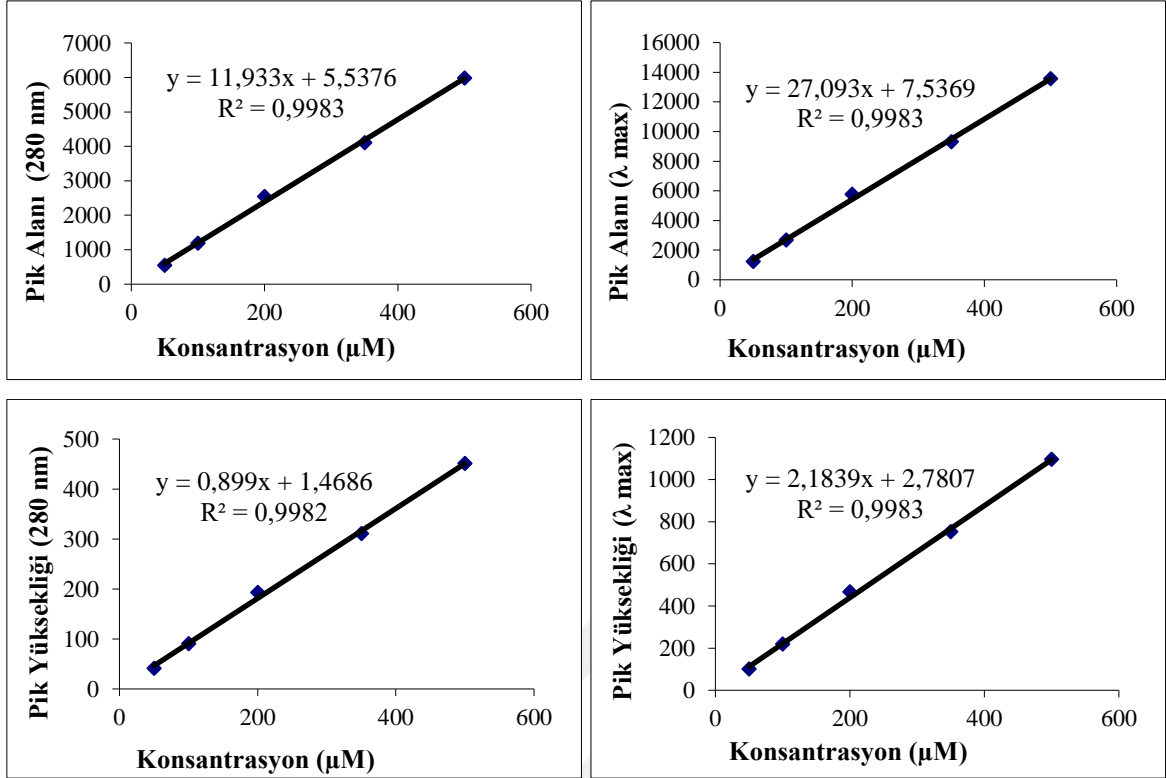
Şekil 38. Kateşininin 280 nm ($\lambda_{\text{maks.}}$)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



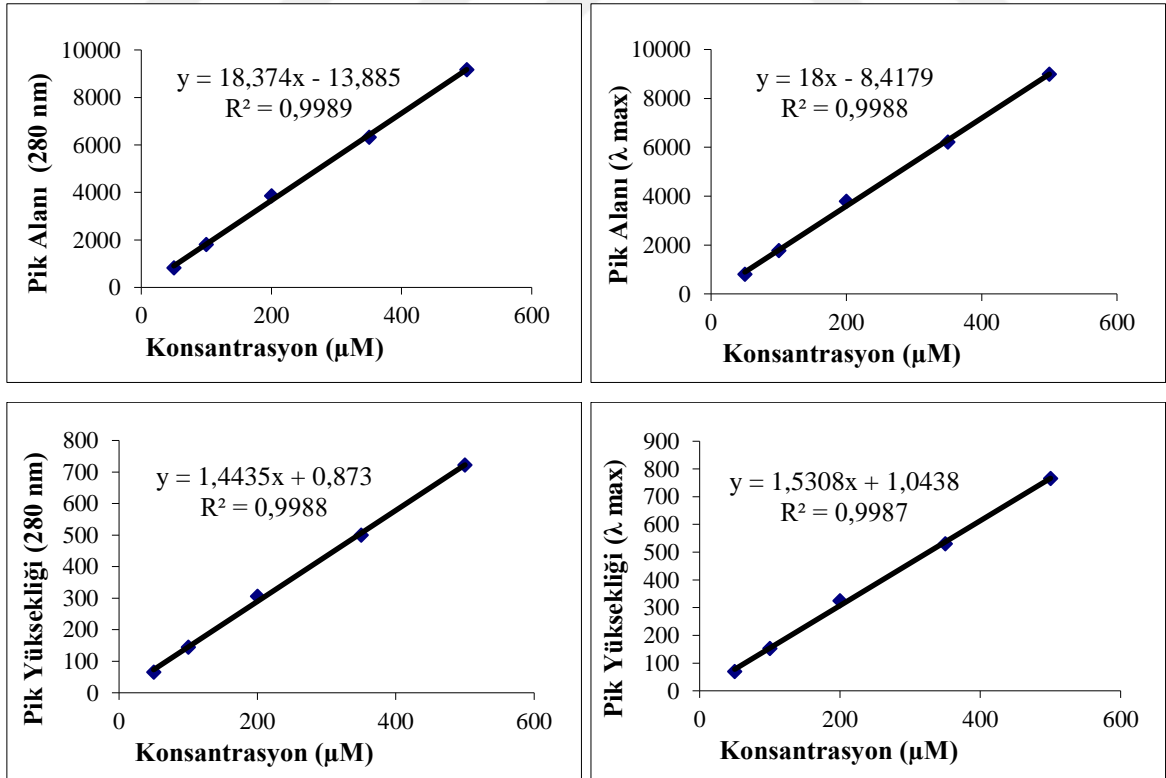
Şekil 39. Klorojenik asitin 280 nm ve λ_{maks} . (324 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



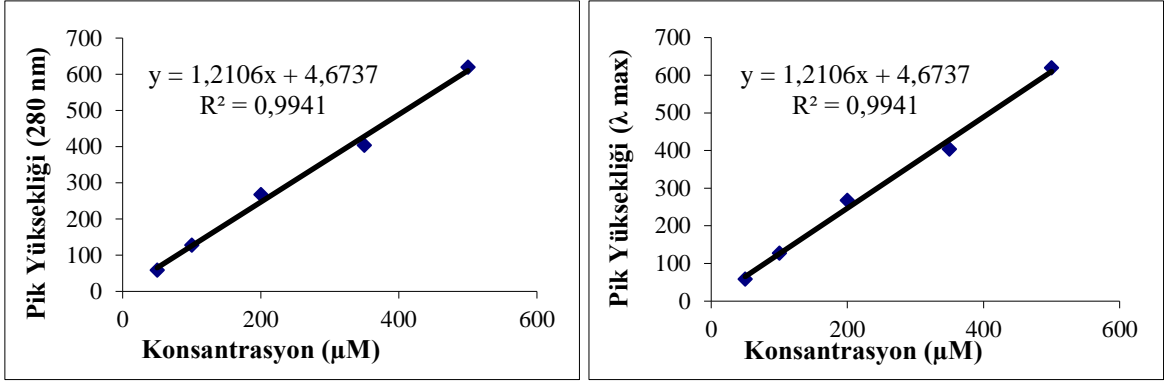
Şekil 40. Vanilik asitin 280 nm ve λ_{maks} . (260 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



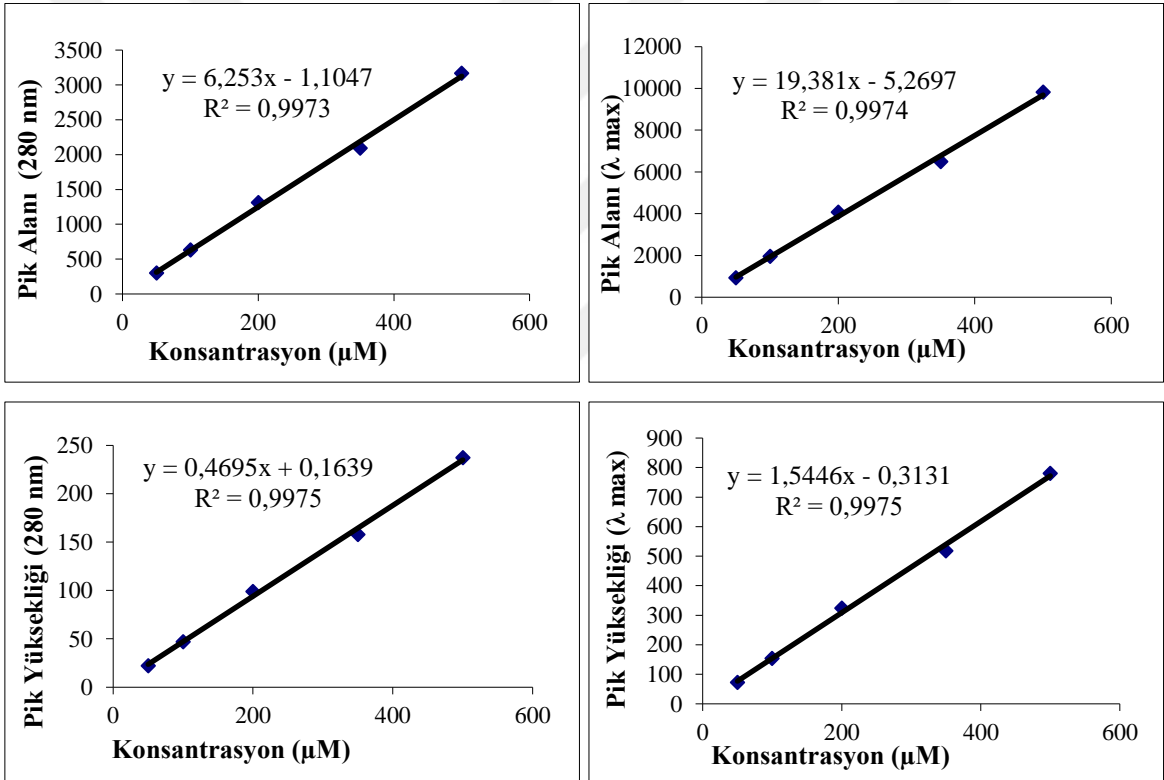
Şekil 41. Kafeik asitin 280 nm ve $\lambda_{\text{maks.}}$ (324 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



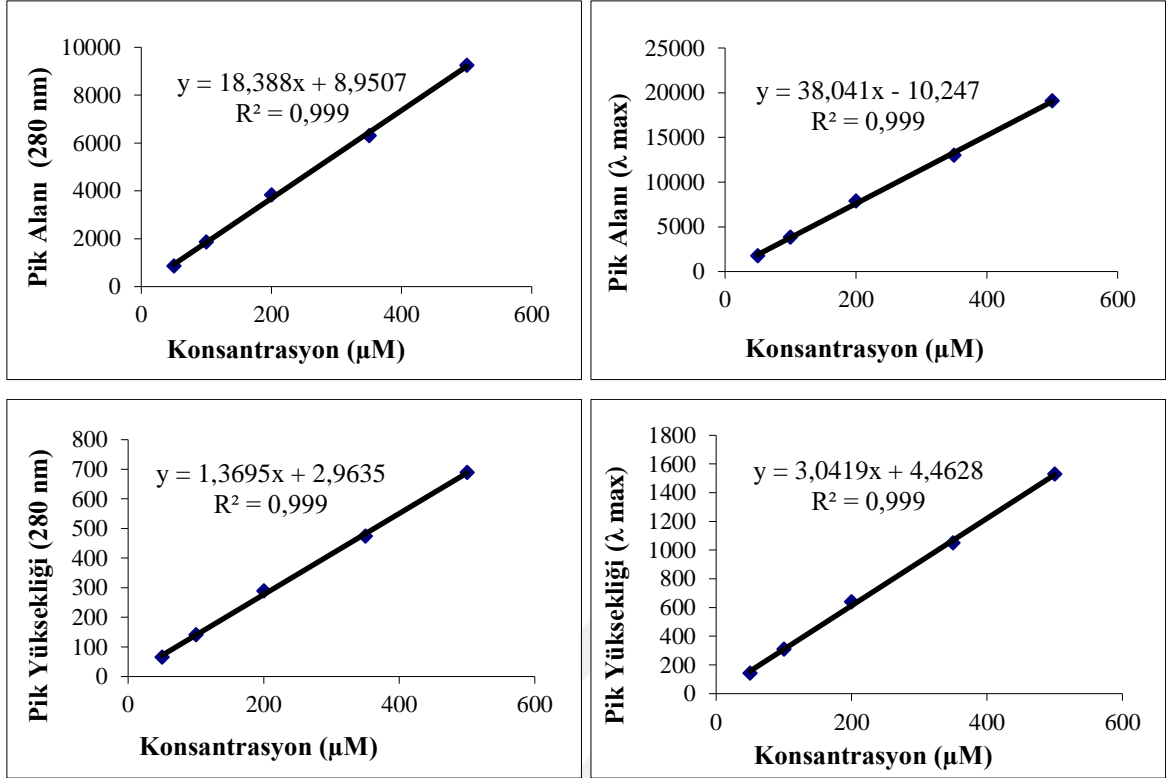
Şekil 42. Siringik asitin 280 nm ve $\lambda_{\text{maks.}}$ (274 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



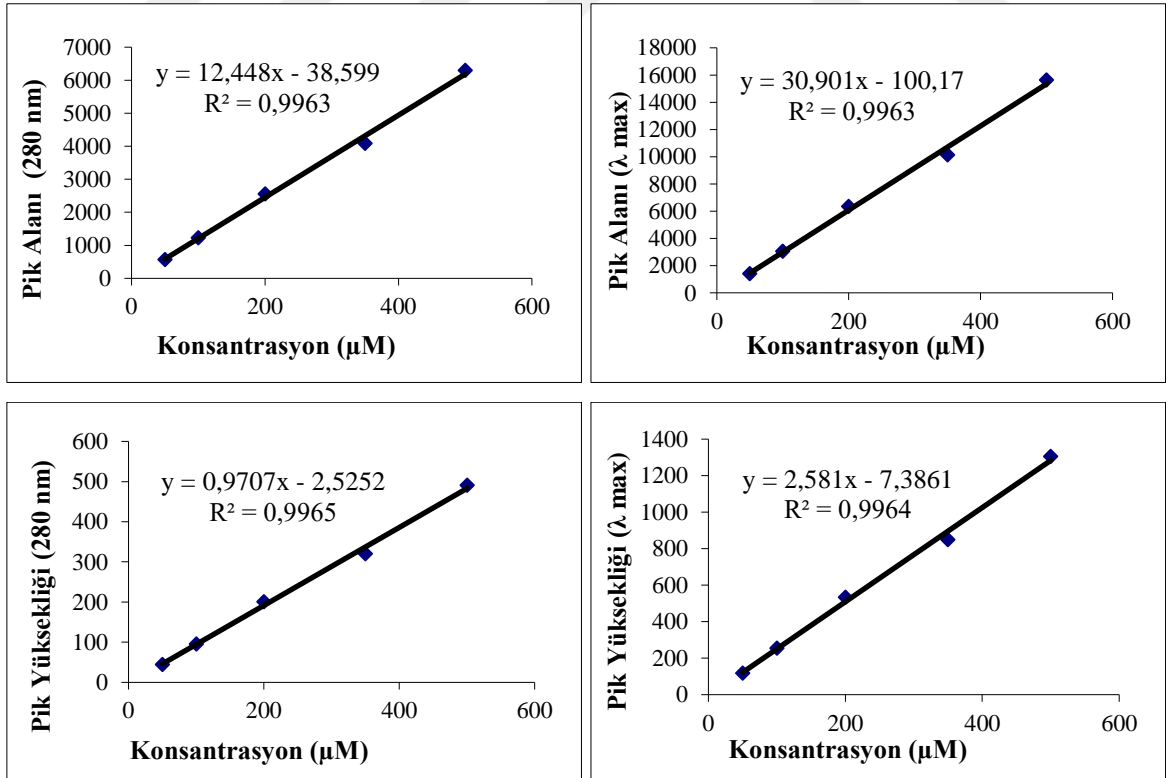
Şekil 43. Vanilin'in 280 nm ($\lambda_{maks.}$)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



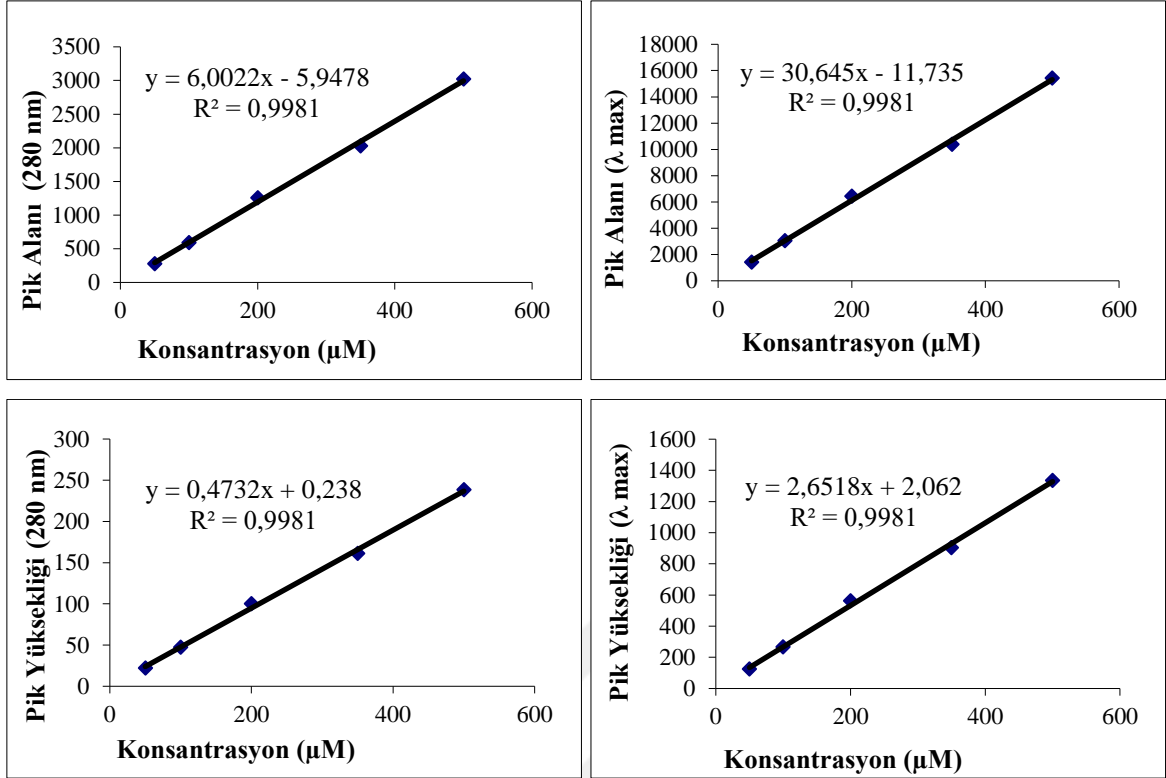
Şekil 44. Siringaldehitin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (308 nm)'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



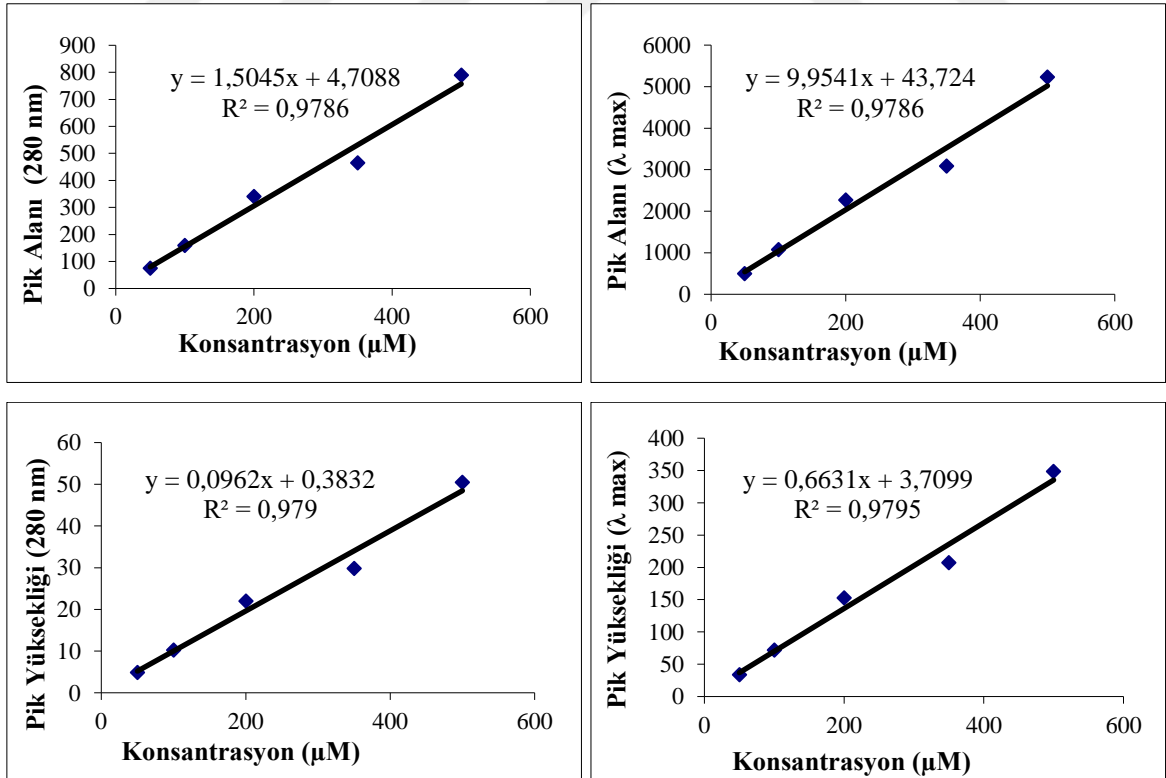
Şekil 45. *p*-Kumarik asitinin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (308 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



Şekil 46. Ferulik asitinin 280 nm ve $\lambda_{maks.}$ (324 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



Şekil 47. Sinapik asitin 280 nm ve $\lambda_{\text{maks.}}$ (324 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri

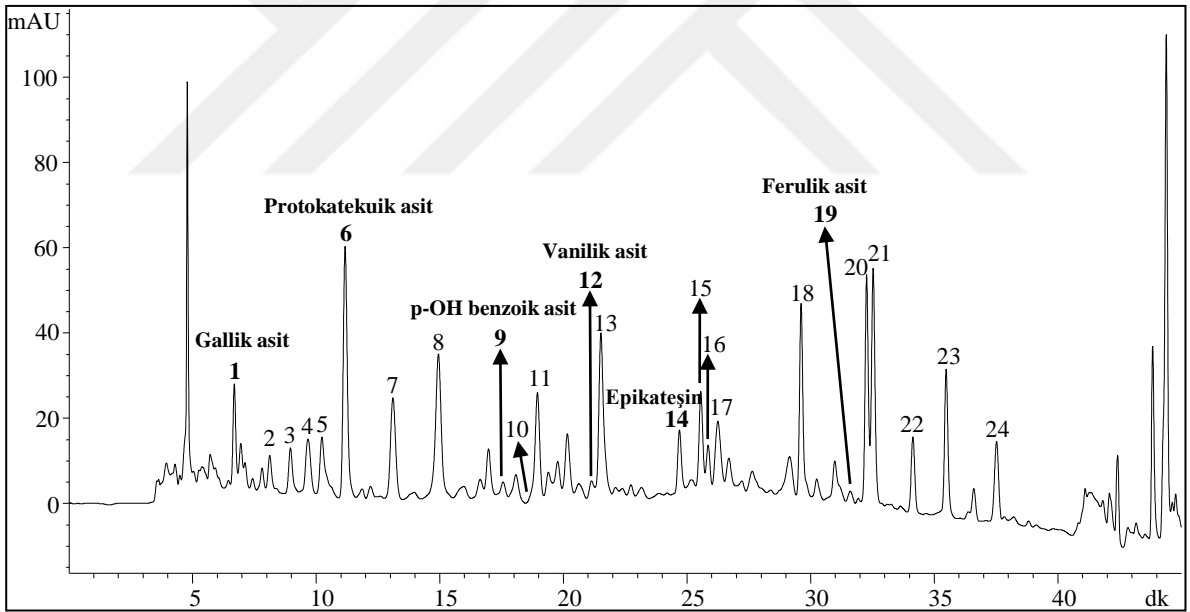


Şekil 48. Benzoik asitin 280 nm ve $\lambda_{\text{maks.}}$ (240 nm)'daki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri

3.1.3. Bitkisel Çay Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV ile Fenolik Bileşen Analizi

Bitkisel çaylarda esas olarak fenolik asitler ve flavanoller olmak üzere bileşiklerin tanımlanması ve miktarlarının tayin edilmesi için bir HPLC-DAD-UV yöntemi geliştirildi (Tablo 11). Yöntemde kullanılan DAD ile 190-800 nm arasında görülen fenolik bileşikler sürekli izlendi. Her bir standardın spektrumu kaydedildi ve HPLC spektrum kütüphanesinde saklandı. Bitkisel çay bileşiklerinin belirlenmesine yönelik kriterler, standartların HPLC kütüphanesi verileriyle bilinmeyen bir bileşiğin tutulma süresinin ve spektrumunun karşılaştırılmasına dayanılarak oluşturulmuştur.

Kromatogramlarda bilinmeyen bileşenlere ait piklerin spektrumlarına bakıldığında bazı piklerin tek bileşenli bazı piklerin ise çok bileşenli olduğu görüldü. Bu yüzden tek bileşenli spektruma sahip bilinmeyen bileşikler ^a ve çok bileşenli spektruma sahip bilinmeyenler ise ^b indisleri kullanılarak verildi.



Şekil 49. Ihlamur (IHS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 49'da ıhlamur çayının ana bileşenlerinin DAD-280 nm ile analiz edilip bazı bileşiklerin aydınlatıldığı kromatogram verilmiştir. Standartların spektrumları ve tutulma zamanları karşılaştırıldığında altı tane bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. Bunlar 1 (gallik asit), 6 (protokatekuik asit), 9 (*p*-OH benzoik asit), 12 (vanilik asit) ve 19 (ferulik asit) nolu bileşiklerdir.

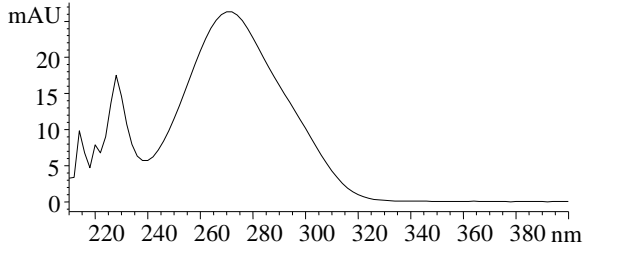
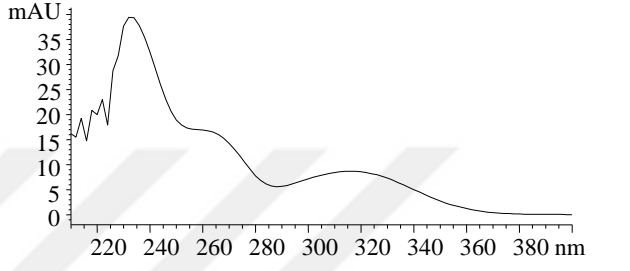
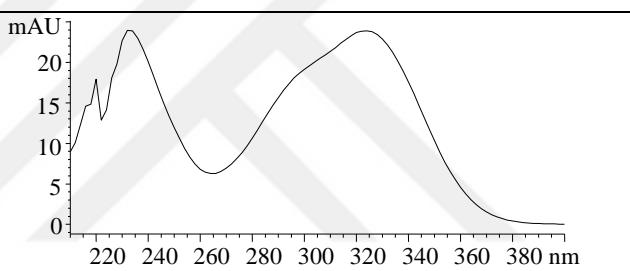
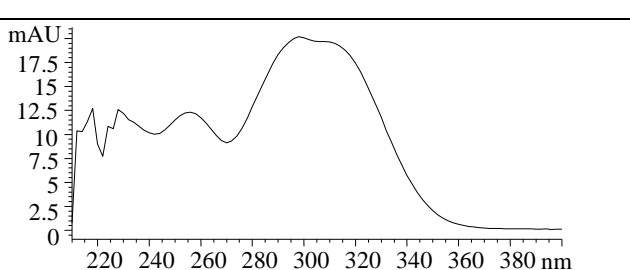
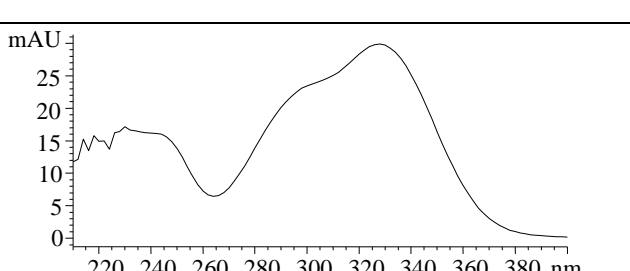
Aynı zamanda literatürdeki benzer çalışmalara ait spektrumlar (Bailey vd., 1990; García vd., 2017) ve tutulma zamanları incelenerek 18 (Bilinmeyen M)'in kuersetin 3-glukozit, 20 (Bilinmeyen N)'nin kaempferol glikozit ve 21 (Bilinmeyen O)'in kuersetin glukozit olabileceği söylenebilir. Bu bileşiklerin spektrumları flavonol glikozitler ile karakteristik olup, maksimum dalga boyları sırasıyla 256, 266, 352 ;264, 348 ve 254, 266, 352'dir (Tablo 17). 22^a (Bilinmeyen P) nolu bileşik 256 ve 354 nm maksimum dalga boylarında gösterdiği spektrum ile kuersetin glikozitleri ile benzerlik göstermektedir (Lin vd., 2014). Birbiri ile yapısal benzerliklere sahip olduğu düşünülen 23^a (Bilinmeyen R) ve 24^a (Bilinmeyen S) numaralı bileşiklerin maksimum dalga boyları yaklaşık 264 ve 350 nm'dir.

10^b (Bilinmeyen G), 13^b (Bilinmeyen I), 15^a (Bilinmeyen J) ve 17^a (Bilinmeyen L) nolu bileşiklerin spektrumları, çay kateşinlerinin ve onların gallatlarının spektrum karakteristiğidir. Bu spektrumlarda iki özel bant görülmektedir. Bant I, 232-235 nm arasında olup çok az gallik asit takılmasından etkilenmektedir. Band II ise 260-278 (285) nm arasında olup absorpsiyonu daha uzun dalga boylarına kaydırmaya eğilimli olarak gallatlanır (Yao vd., 2004). Çalışmada sonradan yürütülen epikateşin standardının tutulma zamanı ve spektrumuna bakıldığında (Şekil 24, B) 14^a nolu bileşiğin epikateşin olduğu tespit edildi.

3^a (Bilinmeyen B), 5^b (Bilinmeyen D), 7^a (Bilinmeyen E), 8^b (Bilinmeyen F), 11^b (Bilinmeyen H) ve 16^a (Bilinmeyen K) numaralı bileşiklerin spektrumları incelendiğinde, maksimum dalga boylarının 312-328 nm arasında olduğu, hidroksisinnamik asitler (örneğin: klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit) için karakteristik spektrumlar tespit edildi. Dolayısıyla bu bilinmeyen bileşiklerin sinamik asit türevleri olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda yapısı aydınlatılan bileşikler literatürdeki çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir. Farklı ıhlamur türlerindeki fenolik bileşikler incelenmiş ve başlıca fenolik bileşenin protokatekuik asit olduğu tespit edilmiştir (Akyuz vd., 2014; Ieria vd., 2015).

Tablo 17. Ihlamur ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	IHS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumları
1	Gallik asit	6.692	
2 ^a	Bilinmeyen A	8.136	
3 ^a	Bilinmeyen B	8.981	
4 ^b	Bilinmeyen C	9.668	
5 ^b	Bilinmeyen D	10.237	

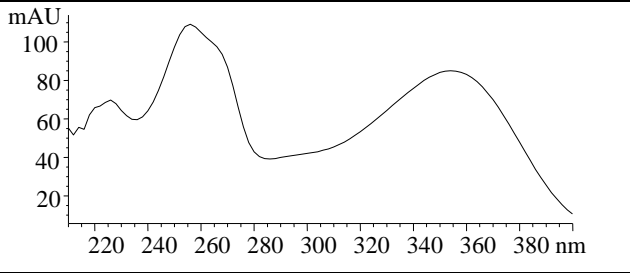
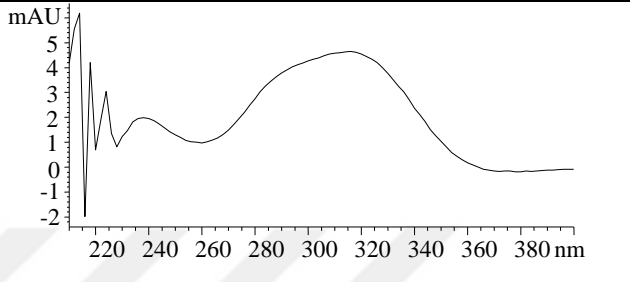
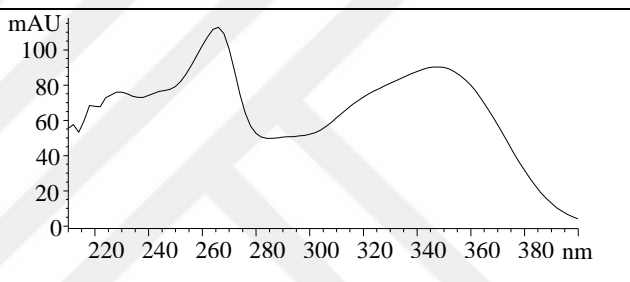
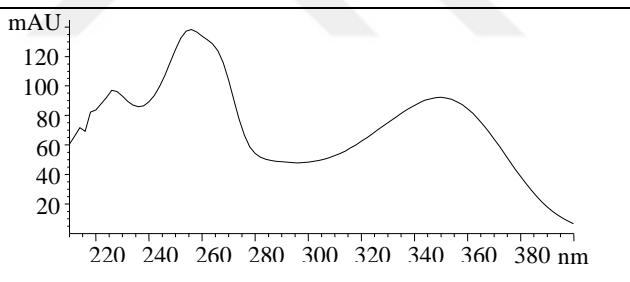
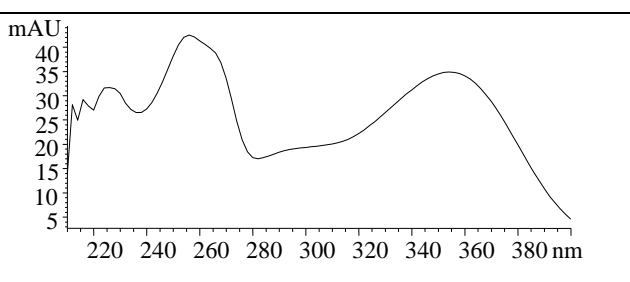
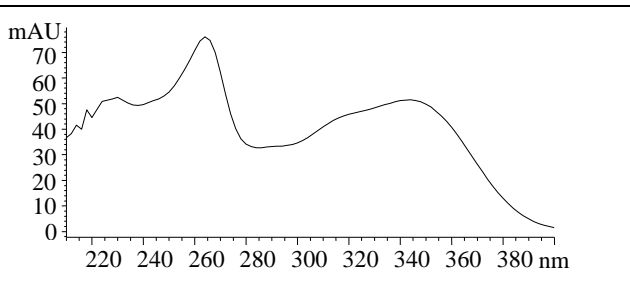
Tablo 17'nin devamı

6 ^a	Protokatekuik asit	11.177	
7 ^a	Bilinmeyen E	13.105	
8 ^b	Bilinmeyen F	14.948	
9	<i>p</i> -OH benzoik asit	17.564	
10 ^b	Bilinmeyen G	18.698	
11 ^b	Bilinmeyen H	18.960	

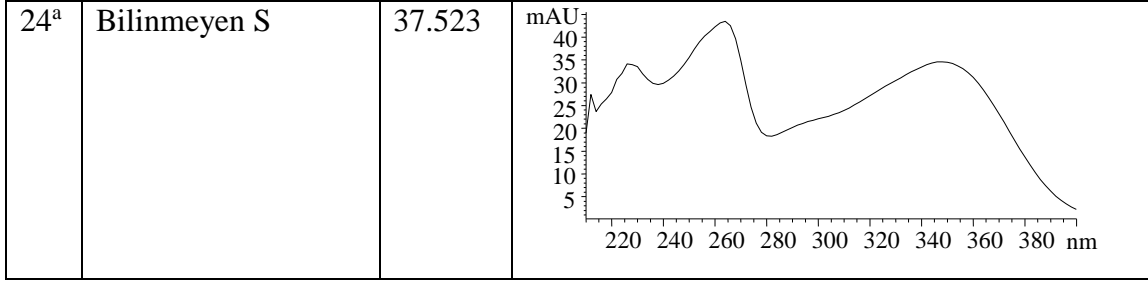
Tablo 17'nin devamı

12	Vanilik asit	21.144	<p>The graph shows the UV-Vis absorption spectrum of Vanilic acid. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from -2 to 6. The spectrum shows a small peak at approximately 220 nm and a larger peak at approximately 260 nm.</p>
13 ^b	Bilinmeyen I	21.520	<p>The graph shows the UV-Vis absorption spectrum of Unknown I. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 120. The spectrum shows a sharp peak at approximately 220 nm and a broader peak at approximately 280 nm.</p>
14 ^a	Epikateşin	24.708	<p>The graph shows the UV-Vis absorption spectrum of Epigallocatechin. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 40. The spectrum shows a sharp peak at approximately 220 nm and a broader peak at approximately 280 nm.</p>
15 ^a	Bilinmeyen J	25.582	<p>The graph shows the UV-Vis absorption spectrum of Unknown J. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 80. The spectrum shows a sharp peak at approximately 220 nm and a broader peak at approximately 280 nm.</p>
16 ^a	Bilinmeyen K	25.859	<p>The graph shows the UV-Vis absorption spectrum of Unknown K. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 17.5. The spectrum shows a broad peak centered around 320 nm.</p>
17 ^a	Bilinmeyen L	26.247	<p>The graph shows the UV-Vis absorption spectrum of Unknown L. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 60. The spectrum shows a sharp peak at approximately 220 nm and a broader peak at approximately 280 nm.</p>

Tablo 17'nin devamı

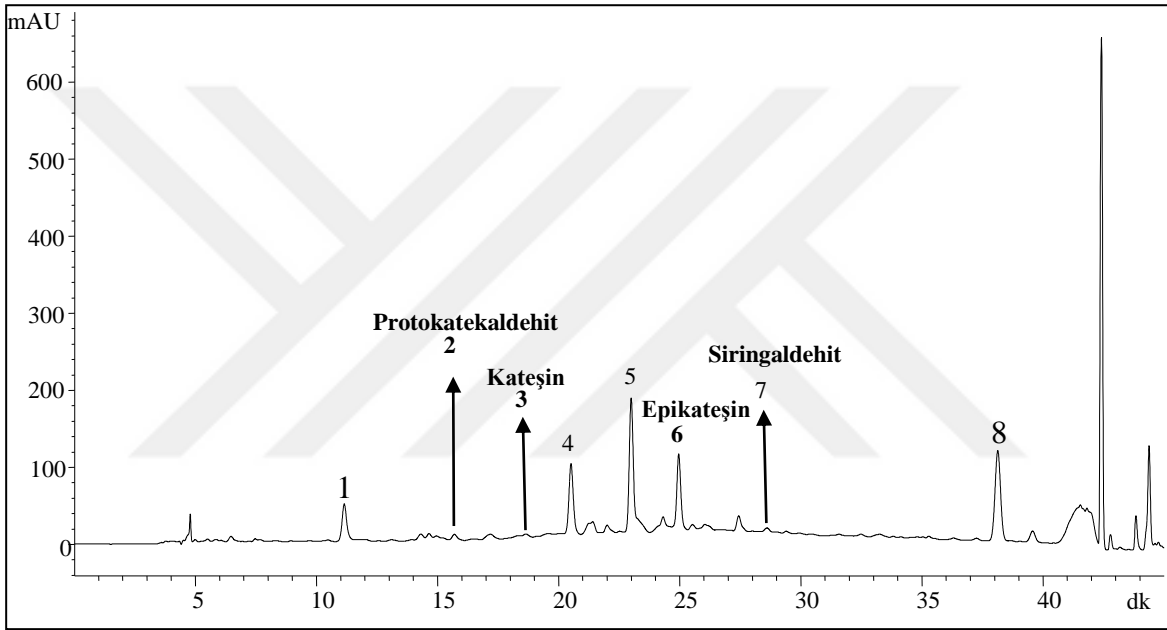
18 ^a	Bilinmeyen M	29.620	
19	Ferulik asit	31.610	
20 ^a	Bilinmeyen N	32.268	
21 ^a	Bilinmeyen O	32.531	
22 ^a	Bilinmeyen P	34.143	
23 ^a	Bilinmeyen R	35.488	

Tablo 17'nin devamı



a: pure pik spektrum (tek bileşenli spektrum)

b: apex pozisyon spektrum (tepe noktasının olduğu yerdeki spektrum)

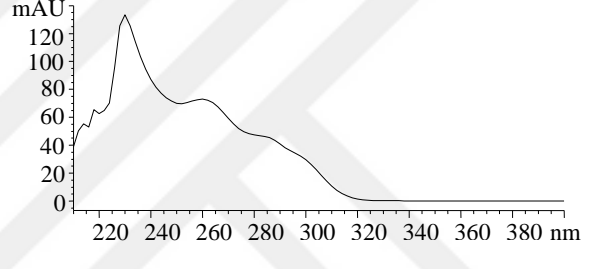
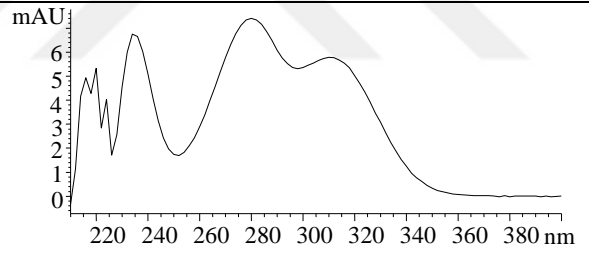
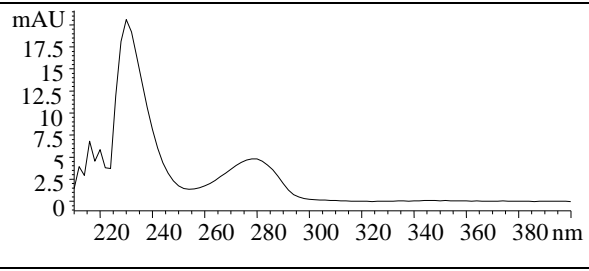
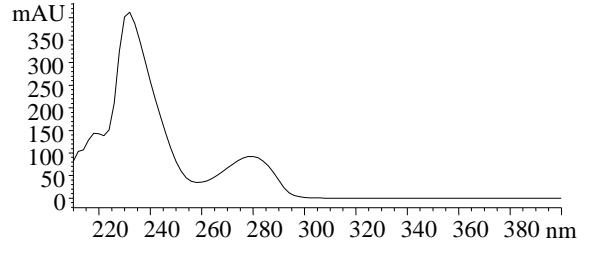


Şekil 50. Tarçın (TAS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 50'de tarçın çayının ana bileşenleri DAD-280 nm ile analiz edilip, standartların spektrumları ve tutulma zamanları karşılaştırılarak üç tane bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. Bunlar 2 (protokatekualdehit veya 3,4-dihidroksibenzaldehid), 3 (kateşin) ve 7 (siringaldehit) nolu bileşiklerdir. 6 nolu bileşiğin ise standardın tutulma zamanı, spektrum ve literatür karşılaştırılması (Şekil 24, B) ile epikateşin olduğu tespit edildi. Tutulma zamanı 11.148 olan 1 nolu bileşik (Bilinmeyen A) protokatekuik asit ve kateşinlere ait spektrumların bir karışımı olduğu tespit edildi. 4^a (Bilinmeyen B) ve 5^a (Bilinmeyen C) nolu bileşiklerde kateşin türevlerine karakteristik spektrumlar elde edildiğinden bunların kateşin türevi bileşikler olduğu söylenebilir. Literatürde de tarçında en fazla bulunan kateşinler kateşin ve epikateşindir (Vallverdú-queralt vd., 2014). Ayrıca

yapılan çalışmalara göre ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan çözücü, tarçın ekstraktının kimyasal özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Genel olarak tarçında bulunan fenolik bileşikler gallik asit, vanilik asit, klorojenik asit, tannik asit, sinnamik asit, şiringik asit, sinapik asit, kafeik asit, kumarik asit, *p*-OH benzoik asit, *p*-hidroksibenzaldehid ve ferulik asittir (Jiao vd., 2013; Li vd., 2013; Helal vd., 2014; Klejduš ve Kováčik, 2016). Tablo 18’de kromatogramda numaralandırılmış olan her bir pike ait olan DAD spektrumları verilmiştir.

Tablo 18. Tarçın ekstraktındaki bileşikler, RT’leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

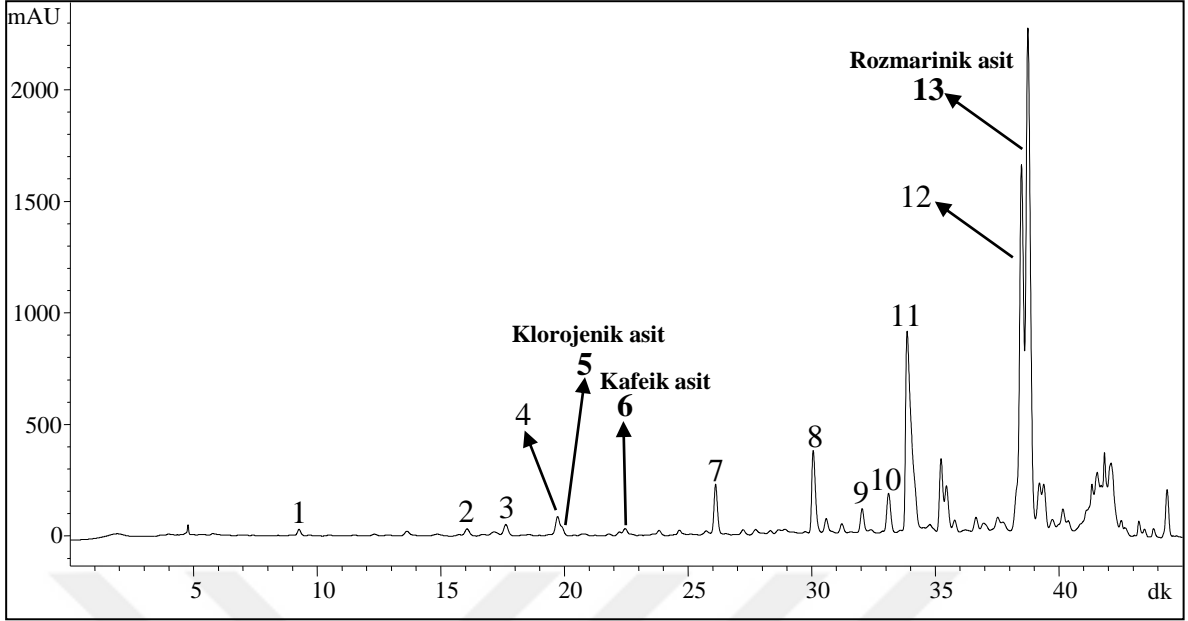
No	Bileşik Adı	RT (dk)	TAS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1 ^b	Bilinmeyen A	11.148	
2	Protokatekualdehit	15.688	
3	Kateşin	18.648	
4 ^a	Bilinmeyen B	20.506	

Tablo 18'in devamı

5 ^a	Bilinmeyen C	22.990	
6	Epikateşin	24.957	
7	Siringaldehit	28.605	
8 ^a	Bilinmeyen D	38.135	

a: pure pik spektrum (tek bileşenli spektrum)

b: apex pozisyon spektrum (tepe noktasının olduğu yerdeki spektrum)



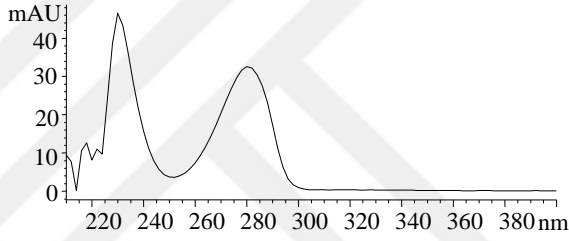
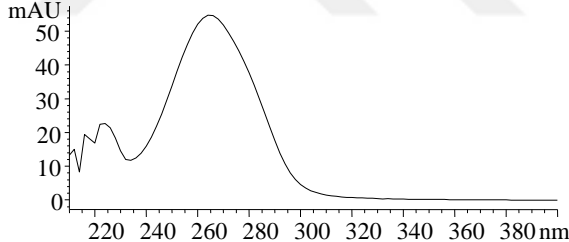
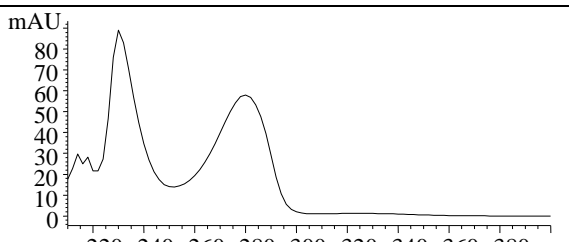
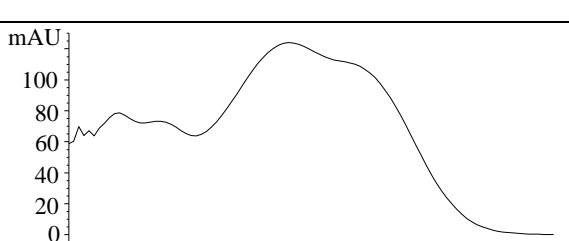
Şekil 51. Adaçayı (ADS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 51'de adaçayının DAD-280 nm'de elde edilen kromatogramına bakıldığında, 5^b (klorojenik asit) ve 6^a (kafeik asit) nolu bileşiklerin yapısı aydınlatılmıştır. Kromatogramda major bileşen olan 13^a nolu pikin spektrumuna bakıldığında (Tablo 19) literatür verilerine göre rozmarinik asit olduğu düşünüldü. Böylece çalışmaya sonradan dahil edilen rozmarinik asit standardının tutulma zamanı ve spektrumuna bakılarak (Şekil 24, B) 13^a nolu bileşiğin rozmarinik asit olduğu tespit edildi.

1^a (Bilinmeyen A) ve 3^a (Bilinmeyen C) numaralı bileşiklere ait spektrumlar incelendiğinde, maksimum absorpsiyon dalga boylarının 230 ve 280 nm olduğu ve dolayısıyla bu iki bileşiğin yapısal benzerlikler gösterebileceği düşünülmektedir. Literatürde adaçayında yapısı aydınlatılan bileşiklere bakıldığında, bu bileşiklerin Danshensu ('Danshen' denilen *Salvia miltiorrhiza* Bunge kökünden izole edilen suda çözünen fenolik bir bileşik) olduğu tespit edildi (Shi ve Chang, 2003; Liu vd., 2007; Zimmermann vd., 2011). 7^a (Bilinmeyen E) nolu bileşik 232, 270 ve 336 nm'deki maksimum dalga boylarına sahip olup, apigenin flavonoid glikozitleri ile yapısal benzerlik göstermektedir (Zimmermann vd., 2011; Benayad vd., 2014). 8^a (Bilinmeyen F) nolu bileşimde benzer şekilde bir flavonoid glikoziti olduğu söylenebilir. 10^a (Bilinmeyen H) ve 11^b (Bilinmeyen I) nolu bileşikler benzer spektrumlara sahip olup maksimum dalga boyları 256, 268 ve 348 nm'dir. Literatürle karşılaştırıldığında luteolin flavonoidinin maksimum dalga boyunun 256 ve 348 olduğu görülmektedir (Zimmermann vd., 2011;

Cvetkovikj vd., 2013). Buna göre bu bileşiklerin luteolin glikozit ya da rutinosit isomerleri olabileceği söylenebilir. Maksimum dalga boyu 288 ve 324 nm olan 12^a (Bilinmeyen J) nolu major bileşenin literatür ile karşılaştırılması sonucu salvianolik asit isomerleri olduğu söylenebilir (Liu vd., 2007; Cvetkovikj vd., 2013). Birer sinamik asit türevi olan 5^b (Klorojenik asit) ve 6^a (kafeik asit) nolu bileşiklerin spektrumları ile benzerlik gösteren 4^b (Bilinmeyen D) nolu bileşimde bir sinamik asit türevi olabileceği söylenebilir. Tablo 19’da kromatogramda numaralandırılmış olan her bir pike ait olan DAD spektrumları verilmiştir.

Tablo 19. Adaçayı ekstraktındaki bileşikler, RT’leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	ADS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1 ^a	Bilinmeyen A	9.259	
2 ^a	Bilinmeyen B	16.068	
3 ^a	Bilinmeyen C	17.608	
4 ^b	Bilinmeyen D	19.709	

Tablo 19'un devamı

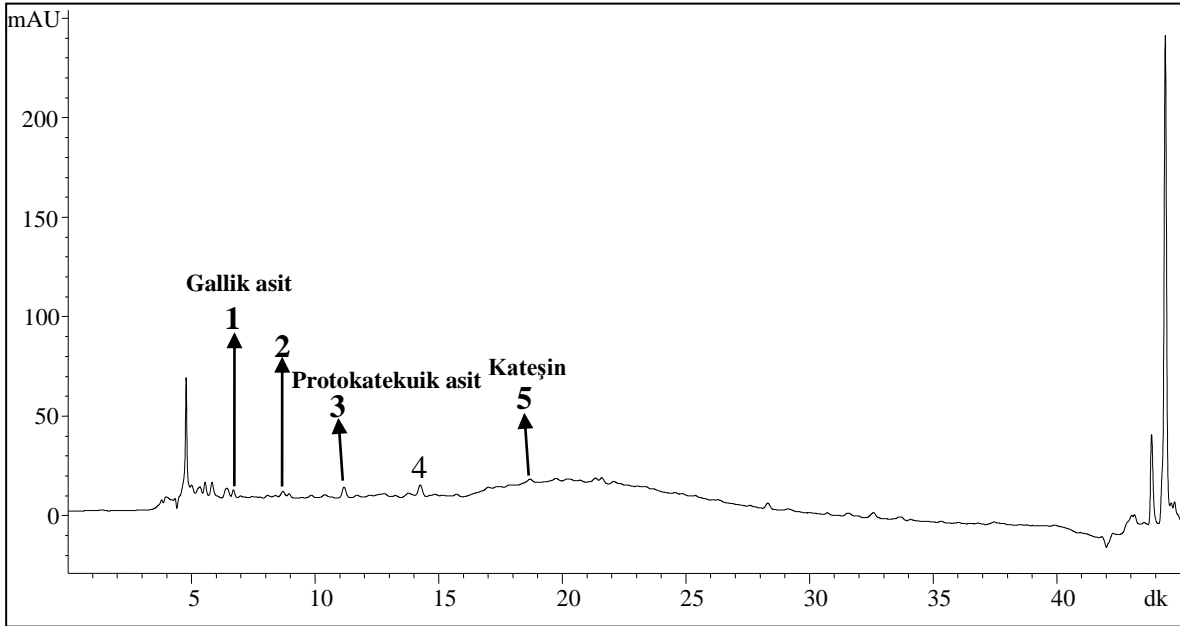
5 ^b	Klorojenik asit	19.889	
6 ^a	Kafeik asit	22.405	
7 ^a	Bilinmeyen E	26.061	
8 ^a	Bilinmeyen F	29.992	
9 ^a	Bilinmeyen G	31.985	
10 ^a	Bilinmeyen H	33.052	

Tablo 19'nin devamı

11 ^b	Bilinmeyen I	33.770	
12 ^a	Bilinmeyen J	38.387	
13 ^a	Rozmarinik asit	38.640	

a: pure pik spektrum (tek bileşenli spektrum)

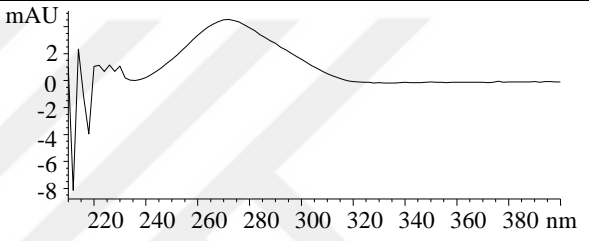
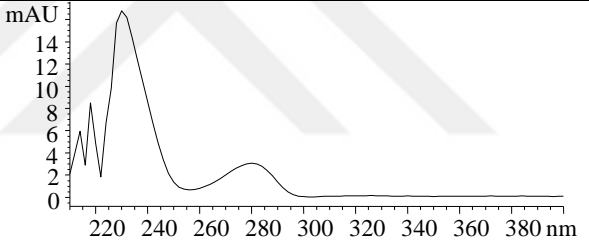
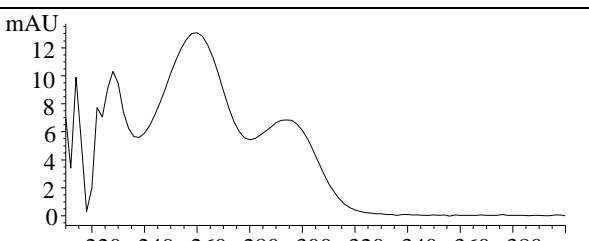
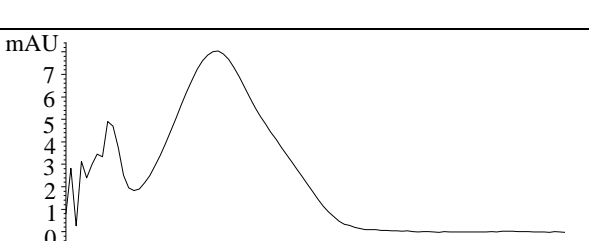
b: apex pozisyon spektrum (tepe noktasının olduğu yerdeki spektrum)



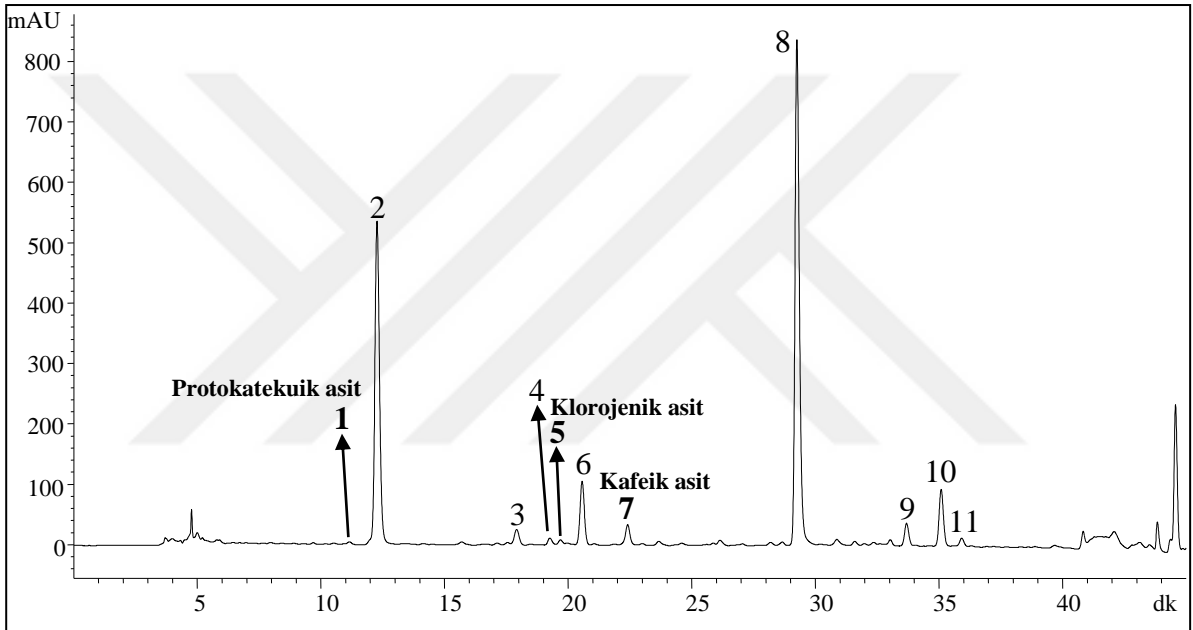
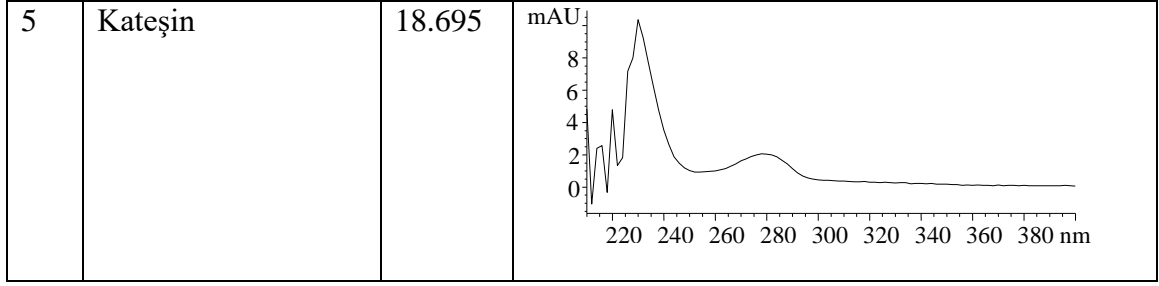
Şekil 52. Kuşburnu (KUS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 52’de kuşburnu çayının DAD-280 nm’de elde edilen kromatogramına bakıldığında, 1^a (gallik asit), 3 (protokatekuik asit) ve 5 (kateşin) nolu bileşiklerin yapısı aydınlatılmıştır. 2^a (Bilinmeyen A) nolu bileşiğe ait spektrum incelendiğinde, maksimum absorpsiyon dalga boyunun 230 ve 280 nm olduğu ve dolayısıyla bu bileşiğin kateşinler ile yapısal benzerlikler gösterebileceği düşünülmektedir. Tablo 20’de kromatogramda numaralandırılmış olan her bir pike ait olan DAD spektrumları verilmiştir.

Tablo 20. Kuşburnu ekstraktındaki bileşikler, RT’leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	KUS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	6.698	
2 ^a	Bilinmeyen A	8.701	
3	Protokatekuik asit	11.174	
4 ^a	Bilinmeyen B	14.255	

Tablo 20'nin devamı

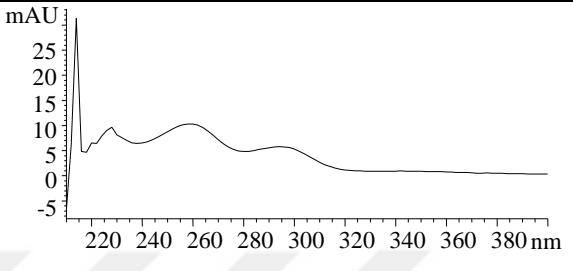
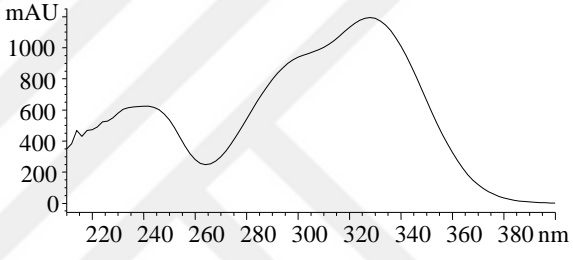
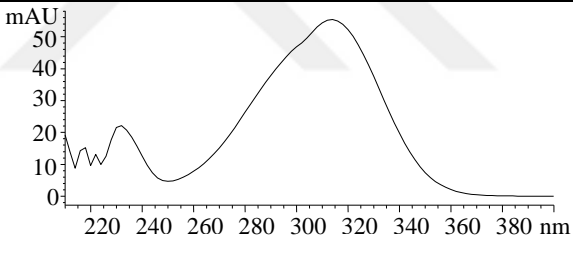
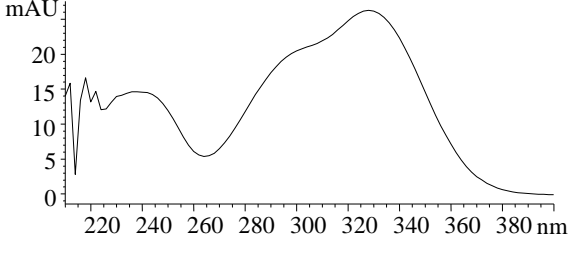
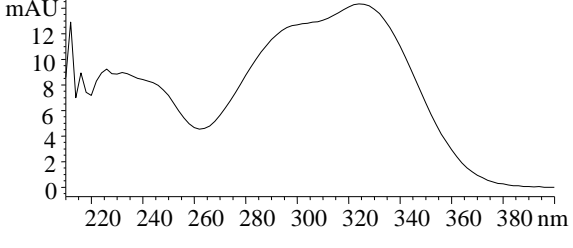


Şekil 53. Ekinezya (EKS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 53'de ekinezya çayının DAD-280 nm'de elde edilen kromatogramında görüldüğü gibi, 1 (protokatekuik asit), 5 (klorojenik asit) ve 7 (kafeik asit) nolu bileşiklerin yapısı aydınlatılmıştır. 2^a (Bilinmeyen A), 4^a (Bilinmeyen C), 6^a (Bilinmeyen D), 8^a (Bilinmeyen E), 10^a (Bilinmeyen G) ve 11^a (Bilinmeyen H) numaralı bileşiklerin Tablo 21'deki spektrumları incelendiğinde, maksimum absorpsiyon dalga boylarının 240 ve 330 nm olduğu görülmektedir. Literatüre bakıldığında bu bileşiklerin sinamik asit ve türevlerinin (klorojenik asit, kafeik asit gibi) spektrumlarıyla benzerlik gösterdikleri, dolayısıyla bu bileşiklerin sinamik asit türevi olabilecekleri söylenebilir. Aynı şekilde 3^a (Bilinmeyen B) ve 9^a (Bilinmeyen F) nolu bileşiklerin maksimum absorpsiyon dalga boyları yaklaşık 230 ve 310 nm olup sinamik asit türevlerinin (*p*-kumarik asit gibi)

spektrumları ile benzerlik gösterdiğinden bu bileşiklerin de sinamik asit türevi olabilecekleri söylenebilir.

Tablo 21. Ekinezya ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

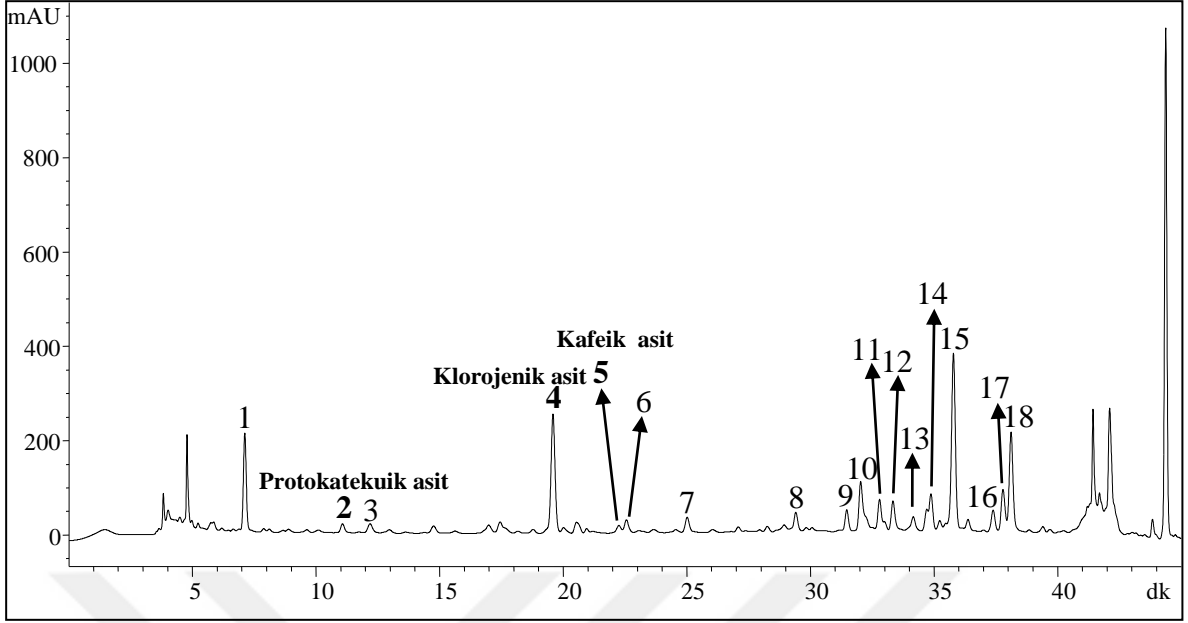
No	Bileşik Adı	RT (dk)	EKS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Protoketekuik asit	11.191	
2 ^a	Bilinmeyen A	12.324	
3 ^a	Bilinmeyen B	17.978	
4 ^a	Bilinmeyen C	19.310	
5	Klorojenik asit	19.727	

Tablo 21'in devamı

6 ^a	Bilinmeyen D	20.604	
7	Kafeik asit	22.449	
8 ^a	Bilinmeyen E	29.252	
9 ^a	Bilinmeyen F	33.668	
10 ^a	Bilinmeyen G	35.065	
11 ^a	Bilinmeyen H	35.897	

a: pure pik spektrum (tek bileşenli spektrum)

b: apex pozisyon spektrum (tepe noktasının olduğu yerdeki spektrum)



Şekil 54. Papatya (PAS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 54'de papatya çayının DAD-280 nm'de elde edilen kromatogramına bakıldığında, 2 (protokatekuik asit), 4 (klorojenik asit) ve 5 (kafeik asit) nolu bileşiklerin yapısı aydınlatılmıştır. 3^a (Bilinmeyen B), 10^b (Bilinmeyen G), 14^a (Bilinmeyen K), 15^a (Bilinmeyen L) ve 18^a (Bilinmeyen O) numaralı bileşiklerin Tablo 22'deki spektrumlarına bakıldığında, maksimum absorpsiyon dalga boylarının 240, 294 ve 326 nm olduğu ve bu spektrumlar sinamik asit türevleri ile benzerlik gösterdiğinden bu bileşiklerin sinamik asit türevleri olabileceği söylenebilir. 11^a (Bilinmeyen H) nolu bileşiğin sahip olduğu maksimum absorpsiyon dalga boyları (228, 267 ve 336 nm) ve spektrumun literatür karşılaştırılmasında, bu bileşiğin apigenin glikozitlerinin bir türevi olduğu söylenebilir (Weber vd., 2008; Avula vd.,2014).

8^a (Bilinmeyen E), 12^a (Bilinmeyen I), 16^a (Bilinmeyen M) ve 17^a (Bilinmeyen N) numaralı bileşiklerin maksimum absorpsiyon dalga boyları 260, 276 ve 356 nm ise olup spektrumları benzerlik gösteren bu bileşiklerin literatürdeki bazı flavonoid glikozitlerle (mirisetin, luteolin gibi) yapısal benzerlik gösterdiği söylenebilir (Fang vd., 2015). Aynı şekilde 258 ve 368 nm'lerde maksimum absorpsiyon dalga boyu gösteren 13^a (Bilinmeyen J) nolu bileşiğin spektrumu kuersetin glikozitleri ile benzerlik göstermektedir (Fang vd., 2015).

Tablo 22. Papatya ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	PAS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1 ^a	Bilinmeyen A	7.122	<p>The DAD spectrum for compound 1a shows a single broad peak centered at approximately 285 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 200. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380.</p>
2	Protokatekuik asit	11.113	<p>The DAD spectrum for protocatechuic acid shows two distinct peaks. The first peak is at approximately 230 nm and the second, slightly higher peak is at approximately 285 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 40. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380.</p>
3 ^a	Bilinmeyen B	12.228	<p>The DAD spectrum for compound 3a shows a broad peak centered at approximately 320 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 30. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380.</p>
4	Klorojenik asit	19.614	<p>The DAD spectrum for chlorogenic acid shows a broad peak centered at approximately 320 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 450. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380.</p>
5	Kafeik asit	22.283	<p>The DAD spectrum for caffeic acid shows a broad peak centered at approximately 320 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 25. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380.</p>
6 ^a	Bilinmeyen C	25.028	<p>The DAD spectrum for compound 6a shows a broad peak centered at approximately 320 nm. The y-axis represents absorbance in mAU, ranging from 0 to 50. The x-axis represents wavelength in nm, ranging from 220 to 380.</p>

Tablo 22'nin devamı

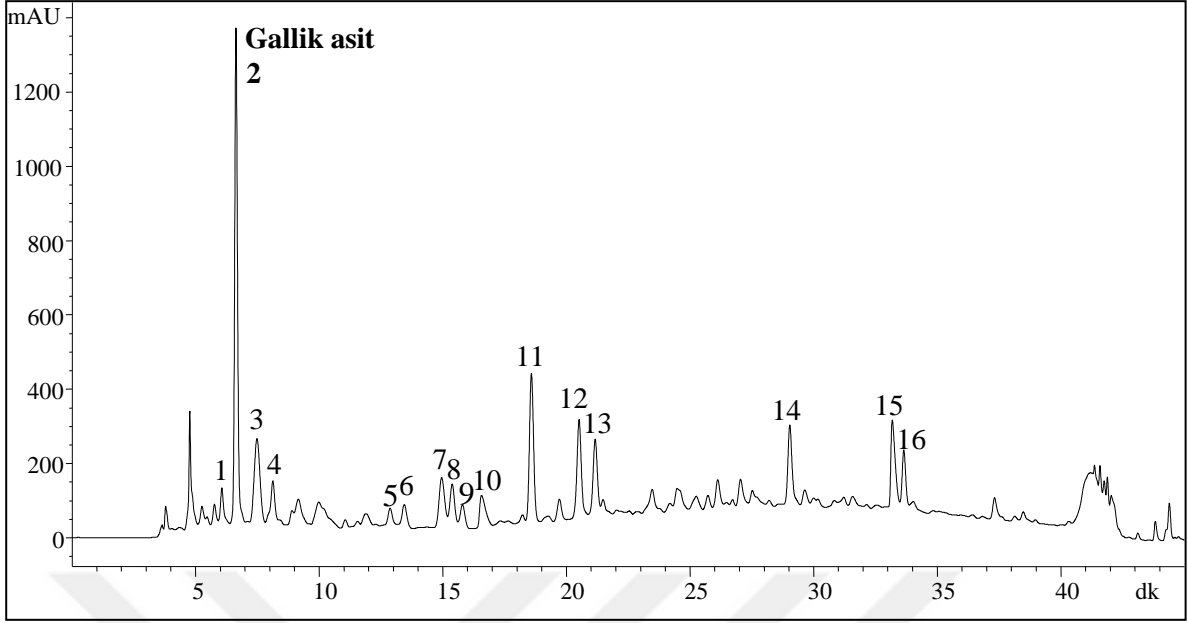
7 ^a	Bilinmeyen D	22.579	
8 ^a	Bilinmeyen E	29.409	
9 ^a	Bilinmeyen F	31.473	
10 ^b	Bilinmeyen G	32.034	
11 ^a	Bilinmeyen H	32.810	
12 ^a	Bilinmeyen I	33.353	

Tablo 22'nin devamı

13 ^a	Bilinmeyen J	34.178	
14 ^a	Bilinmeyen K	34.899	
15 ^a	Bilinmeyen L	35.808	
16 ^a	Bilinmeyen M	37.416	
17 ^a	Bilinmeyen N	37.809	
18 ^a	Bilinmeyen O	38.132	

a: pure pik spektrum (tek bileşenli spektrum)

b: apex pozisyon spektrum (tepe noktasının olduğu yerdeki spektrum)



Şekil 55. Karanfil (KAS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 55'de karanfil çayının DAD-280 nm'de elde edilen kromatogramına bakıldığında, oldukça yüksek konsantrasyonda tespit edilen 2 (gallik asit) nolu bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. Karanfil ekstraktında bulunan bir diğer fenolik asit 15^a (Bilinmeyen N) nolu bileşiktir. Bu bileşiğin maksimum absorpsiyon dalga boyu olan 255 nm'de göstermiş olduğu spektrum (Tablo 23) literatürde elajik asit ile benzerdir (Ratnam vd., 2006).

16^a (Bilinmeyen O) nolu bileşik 256 ve 354 nm maksimum absorpsiyon dalga boylarında gösterdiği spektrum ile kuersetin glikozitleri ile benzerlik göstermektedir (Yao vd., 2004); Lin vd., 2014). Karanfil ekstraktındaki bileşiklerin sahip olduğu spektrumlara (Tablo 23) bakıldığında, 1^a (Bilinmeyen A) ile 4^b (Bilinmeyen C), 3^a (Bilinmeyen B) ile 5^b (Bilinmeyen D), 11^a (Bilinmeyen J) ile 12^a (Bilinmeyen K) ve 7^a (Bilinmeyen F), 13^a (Bilinmeyen L) ile 14^a (Bilinmeyen M) nolu bileşiklerin spektrumları ve maksimum absorpsiyon dalga boyları benzerlik gösterdiğinden bu bileşiklerin yapısal olarak da benzerlik gösterdiği düşünülmektedir.

Tablo 23. Karanfil ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	KAS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1 ^a	Bilinmeyen A	6.064	
2	Gallik asit	6.636	
3 ^a	Bilinmeyen B	7.488	
4 ^b	Bilinmeyen C	8.125	
5 ^b	Bilinmeyen D	12.869	

Tablo 23'ün devamı

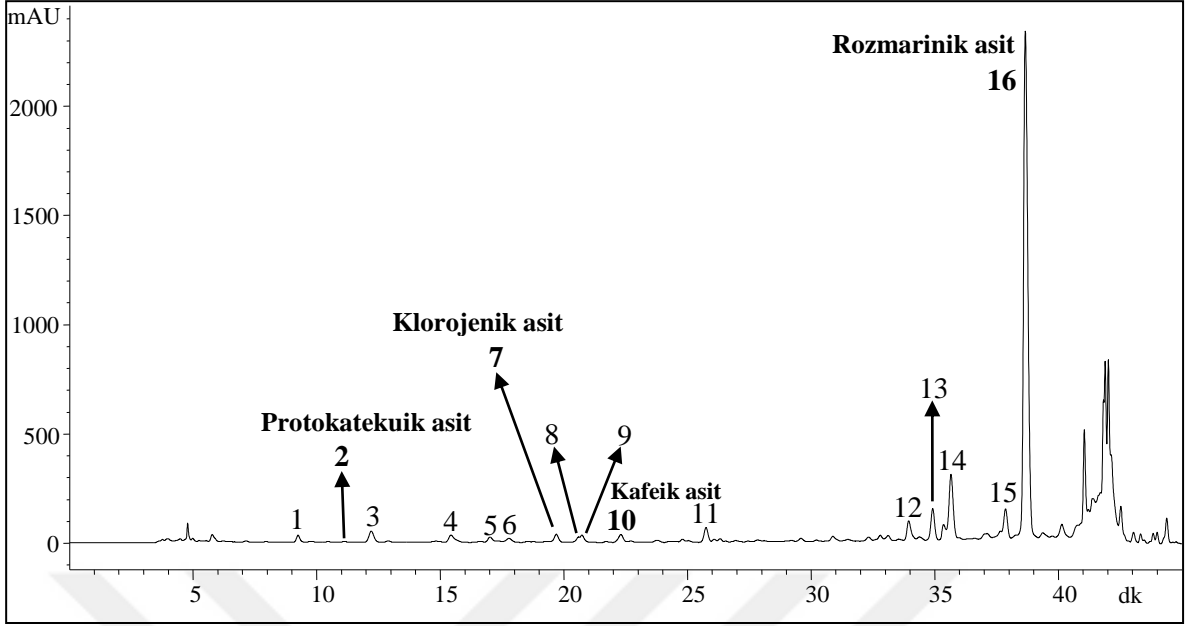
6 ^b	Bilinmeyen E	13.446	
7 ^a	Bilinmeyen F	14.956	
8 ^a	Bilinmeyen G	15.380	
9	Bilinmeyen H	15.796	
10 ^b	Bilinmeyen I	16.556	
11 ^a	Bilinmeyen J	18.586	

Tablo 23'ün devamı

12 ^a	Bilinmeyen K	20.512	
13 ^a	Bilinmeyen L	21.166	
14 ^a	Bilinmeyen M	29.033	
15 ^a	Bilinmeyen N	33.184	
16 ^a	Bilinmeyen O	33.648	

a: pure pik spektrum (tek bileşenli spektrum)

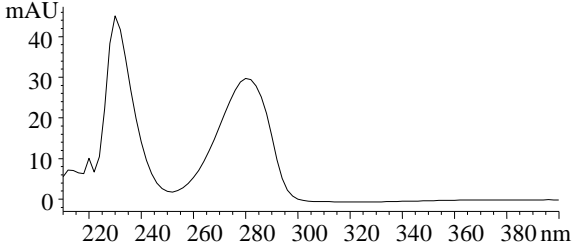
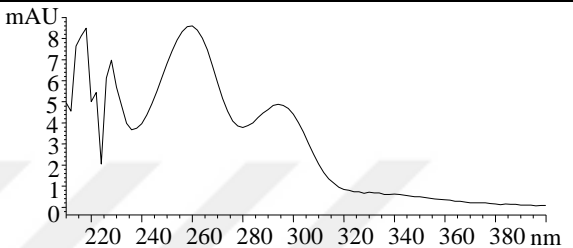
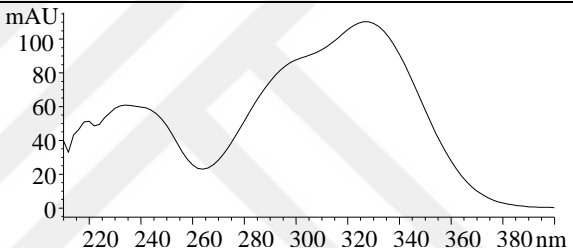
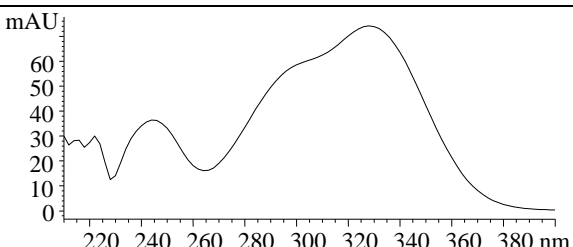
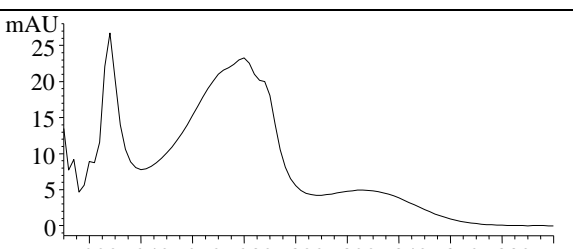
b: apex pozisyon spektrum (tepe noktasının olduğu yerdeki spektrum)



Şekil 56. Nane (NAS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 56'da nane çayının DAD-280 nm'de elde edilen kromatogramına bakıldığında, 2 (protokatekuik asit), 7 (klorojenik asit) ve 10 (kafeik asit) nolu bileşiklerin yapısı aydınlatılmıştır. Kromatogramda major bileşen olan 16^a nolu pikin literatür verilerine göre rozmarinik asite ait olduğu bulundu. Çalışmada yürütülen rozmarinik asit standardının tutulma zamanı ve spektrumuna bakılarak (Şekil 24, B) 16^a nolu bileşiğin rozmarinik asit olduğu tespit edildi. 3^a (Bilinmeyen B), 4^a (Bilinmeyen C), 6^a (Bilinmeyen E), 8^a (Bilinmeyen F), 9^a (Bilinmeyen G) ve 11^a (Bilinmeyen H) nolu bileşiklerin Tablo 24'deki spektrumlarına bakıldığında, maksimum absorpsiyon dalga boylarının yaklaşık 240, 294 ve 326 nm olduğu ve bu spektrumlar sinamik asit türevleri ile benzerlik gösterdiğinden bu bileşiklerin sinamik asit türevleri olabileceği söylenebilir.

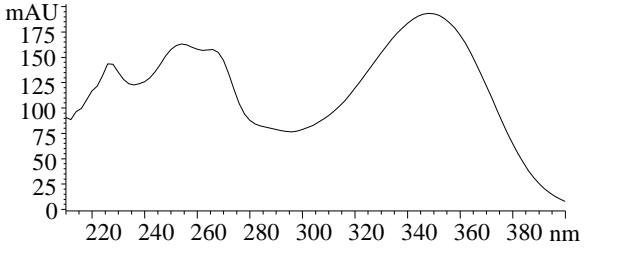
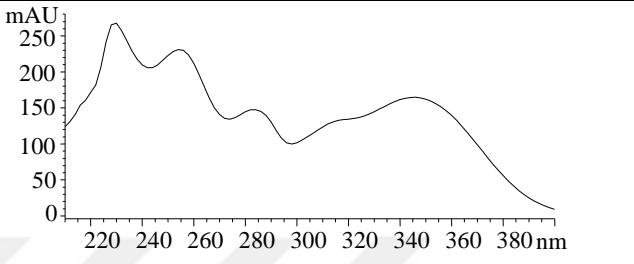
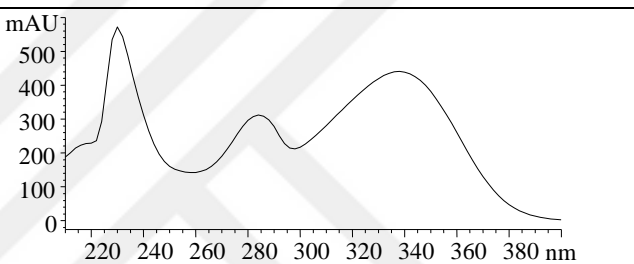
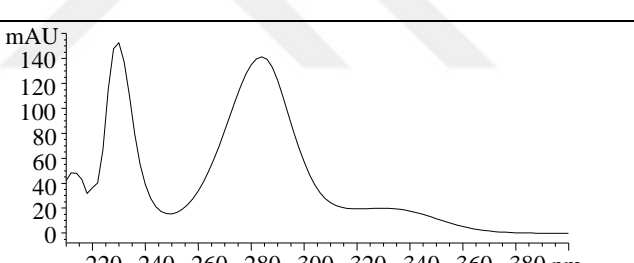
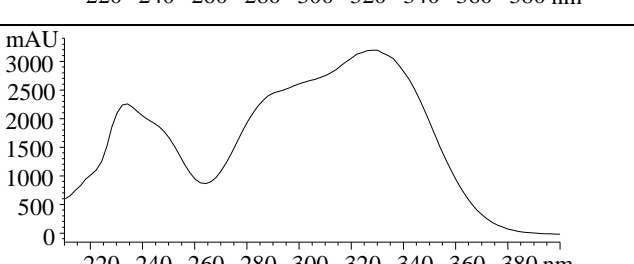
Tablo 24. Nane ekstraktındaki bileşikler, RT'leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	NAS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1 ^a	Bilinmeyen A	9.247	
2	Protokatekuik asit	11.127	
3 ^a	Bilinmeyen B	12.208	
4 ^a	Bilinmeyen C	15.433	
5 ^a	Bilinmeyen D	17.013	

Tablo 24'ün devamı

6 ^a	Bilinmeyen E	17.778	
7	Klorojenik asit	19.696	
8 ^a	Bilinmeyen F	20.599	
9 ^a	Bilinmeyen G	20.733	
10	Kafeik asit	22.308	
11 ^a	Bilinmeyen H	25.751	

Tablo 24'ün devamı

12 ^a	Bilinmeyen I	33.943	
13 ^a	Bilinmeyen J	34.916	
14 ^a	Bilinmeyen K	35.659	
15 ^a	Bilinmeyen L	37.868	
16 ^a	Rozmarinik asit	38.663	

a: pure pik spektrum (tek bileşenli spektrum)

b: apex pozisyon spektrum (tepe noktasının olduğu yerdeki spektrum)

Tablo 25'de çalışılan bütün bitkisel çay ekstraktlarındaki fenolik bileşenler, ekstrakttaki fenolik bileşen miktarları (ppm, mg/L ekstrakt), kuru ekstrakttaki fenolik bileşen miktarları (ppm, mg/kg ekstrakt) ve kuru bitkisel çaydaki fenolik bileşen miktarları (ppm, mg/kg bitkisel çay) olarak verilmiştir.

Tablo 25'in devamı

Vanilin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -kumarik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Siringaldehit	-	2996,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferulik asit	542,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinapik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuru bitkisel çaydaki fenolik bileşen miktarları (ppm, mg/kg bitkisel çay)													
Gallik asit	347,2	-	-	-	985,5	-	-	-	-	20772,0	-	-	-
Protokatekuik asit	1772,2	-	-	-	3897,4	403,5	-	1961,1	-	-	-	1266,7	-
Protokatekualdehit	-	183,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -OH benzoik asit	162,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kateşin	146,5	646,7	-	-	11341,6	-	-	-	-	-	-	-	-
Klorojenik asit	-	-	766,1	-	-	203,0	-	5358,0	-	-	-	1396,8	-
Vanilik asit	141,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kafeik asit	-	-	1113,2	-	-	903,1	-	583,9	-	-	-	1460,1	-
Siringik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vanilin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -kumarik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Siringaldehit	-	292,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferulik asit	81.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinapik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Not: Standart fenolik bileşenlerin kalibrasyon grafikleri μM olarak verilmiştir. Bitkisel çay ekstraktlarında ise fenolik bileşen miktarlarının molar kütelleri kullanılarak konsantrasyonlar ppm olarak verilmiştir.

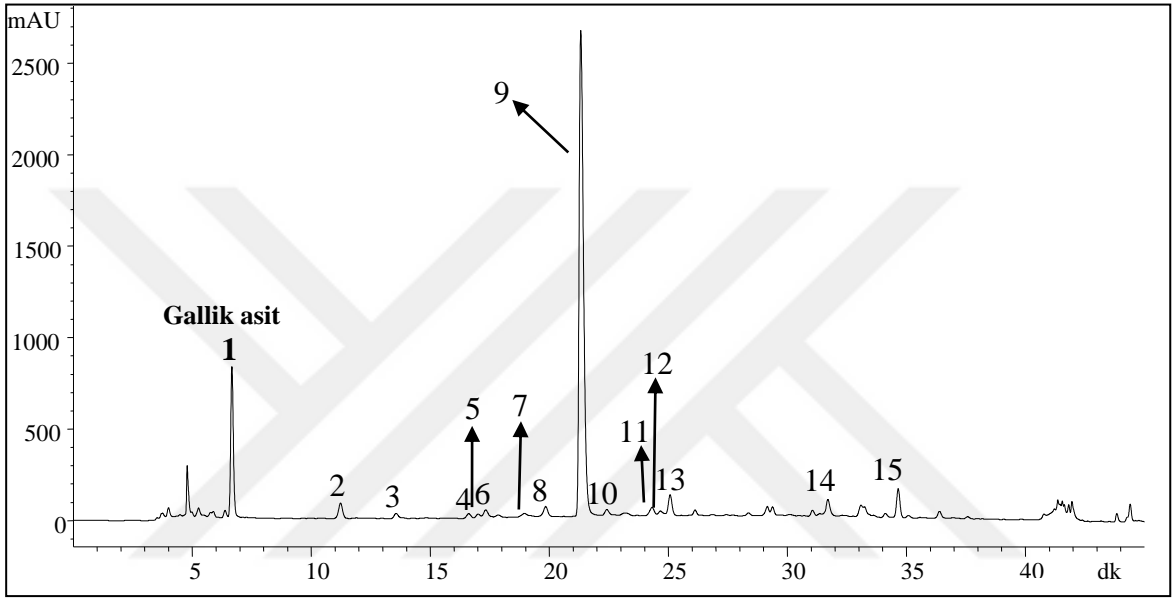
3.1.4. Siyah Çay, Beyaz Çay, Yeşil Çay, Çay Lifi ve Çay Çöpü Ekstraktlarının HPLC-DAD-UV ile Fenolik Bileşen Analizi

Siyah çay, beyaz çay, yeşil çay, çay lifi ve çay çöpü ekstraktlarındaki fenolik asitler ve flavanollerin tanımlanması ve miktarlarının tayin edilmesi için bir HPLC-DAD-UV yöntemi geliştirildi (Tablo 11). Yöntemde kullanılan DAD ile 190-800 nm arasında görülen fenolik bileşikler sürekli izlenerek her bir standardın spektrumu kaydedildi. Numunelerdeki bileşenlerin belirlenmesi, standartların tutulma süresinin ve spektrumunun karşılaştırılması ile oluşturuldu.

Şekil 57’de 2. Nevi siyah çay, Şekil 58’de Altınbaş Klasik siyah çay ve Şekil 59’da Organik Hemşin siyah çay ekstraktlarının kromatogramları, sırasıyla Tablo 26, Tablo 27 ve Tablo 28’de ise bu kromatogramlarda verilen piklerin tutulma süreleri, DAD-280 nm’deki spektral verileri ve yapısı aydınlatılan bileşenlerin adları verilmiştir. Üç siyah çay numunesinde de fenolik bileşiklerden sadece 1 (gallik asit) nolu bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. 2. Nevi siyah çay numunesinde 9 (Bilinmeyen H) numaralı diğer siyah çay numunelerinde ise 8 (Bilinmeyen G) numaralı bileşiğin, hem Bölüm 3.2’de kateşinler ve kafein analiz sonuçlarına hem de literatüre göre siyah çayın başlıca alkaloidi olan kafein olduğu söylenebilir.

2. Nevi siyah çay numunesinde 4 (Bilinmeyen C), 6 (Bilinmeyen E), 10 (Bilinmeyen I) ve 13 (Bilinmeyen L), Altınbaş Klasik ve Organik Hemşin siyah çay numunelerinde ise 4 (Bilinmeyen C), 5 (Bilinmeyen D), 9 (Bilinmeyen H) ve 12 (Bilinmeyen K) numaralı bileşiklerin maksimum absorpsiyon dalga boyları yaklaşık 230 ve 310 nm’dir. Ayrıca bu bileşiklerin spektrumları literatürde bir sinamik asit türevi olan *p*-kumarik asit ile benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla bu bileşiklerin *p*-kumarik asit ile yapısal olarak benzer olabileceği düşünülmektedir. 2. Nevi siyah çay numunesinde 2 (Bilinmeyen A), 5 (Bilinmeyen D), 7 (Bilinmeyen F), 8 (Bilinmeyen G), 11 (Bilinmeyen J) ve 12 (Bilinmeyen K), Altınbaş Klasik ve Organik Hemşin siyah çay numunelerinde ise 2 (Bilinmeyen A), 6 (Bilinmeyen E), 7 (Bilinmeyen F), 10 (Bilinmeyen I) ve 11 (Bilinmeyen J) numaralı bileşiklerin maksimum absorpsiyon dalga boyları kateşin ve türevleri için karakteristik olan yaklaşık 230 ve 278 nm’dir. Dolayısıyla bu bileşiklerin çayda bol miktarda bulunan kateşin türevleri ile yapısal olarak benzer olabileceği düşünülmektedir. 2. Nevi siyah çay numunesinde 14 (Bilinmeyen M) ve Altınbaş Klasik ve Organik Hemşin siyah çay numunelerinde ise 13 (Bilinmeyen L) nolu bileşik 256 ve 354 nm maksimum dalga boylarında gösterdiği spektrum ile kuersetin glikozitleri ile benzerlik göstermektedir

(Yao vd., 2004; Lin vd., 2014). Son olarak 2. Nevi siyah çay numunesinde 15 (Bilinmeyen N) ve Altınbaş Klasik ve Organik Hemşin siyah çay numunelerinde ise 14 (Bilinmeyen M) nolu bileşik ise 266 ve 348 nm dalga boylarında göstermiş olduğu spektrum ile kaempferol glikozitleri ile benzerlik göstermektedir (Yao vd., 2004; Lin vd., 2014; García vd., 2017). 2. Nevi siyah çay ekstraktında 17.008 tutulma zamanına sahip 5 (Bilinmeyen D) nolu bileşiğe diğer siyah çay numunelerinde rastlanmamıştır.



Şekil 57. 2. Nevi Siyah Çay (NÇS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Tablo 26. 2. Nevi Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	NÇS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	6.663	

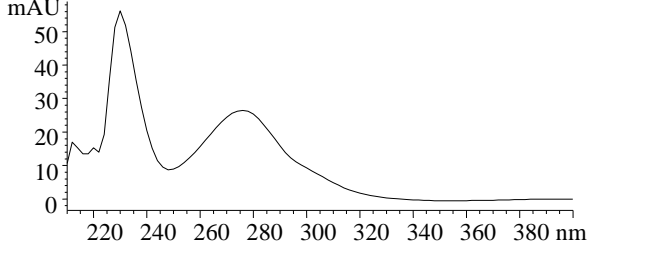
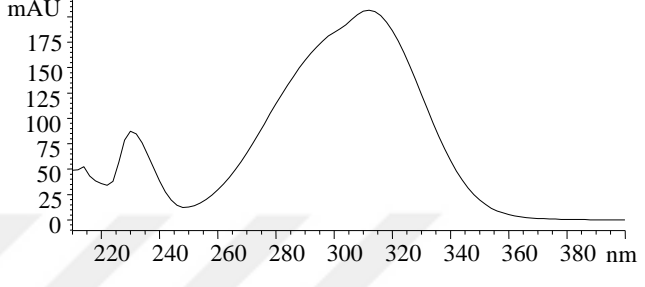
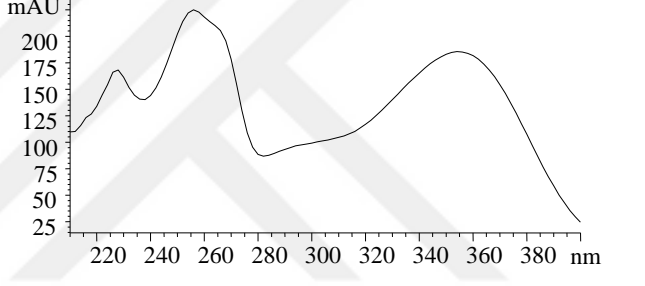
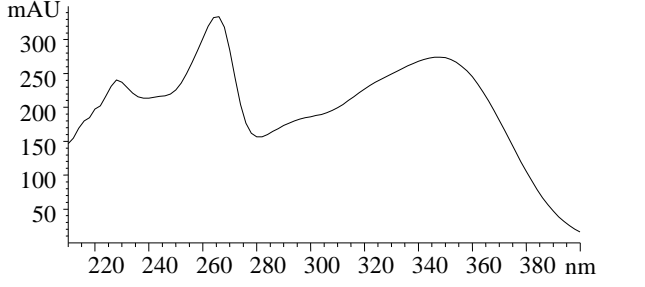
Tablo 26'nın devamı

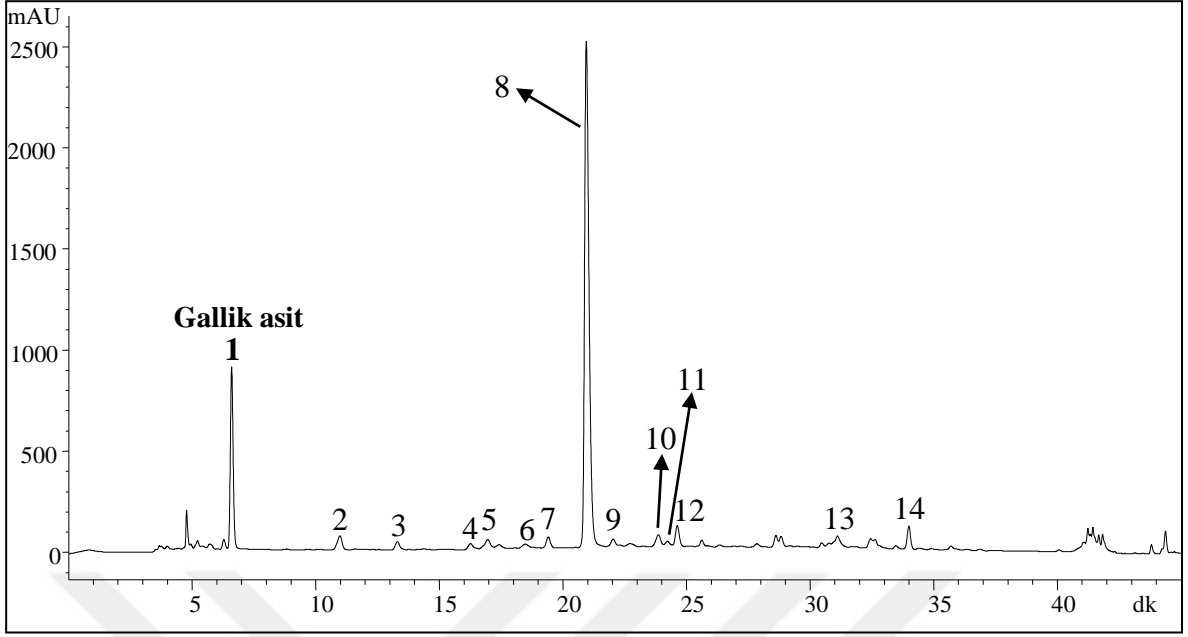
2	Bilinmeyen A	11.230	
3	Bilinmeyen B	13.561	
4	Bilinmeyen C	16.613	
5	Bilinmeyen D	17.008	
6	Bilinmeyen E	17.331	

Tablo 26'nın devamı

7	Bilinmeyen F	18.953	
8	Bilinmeyen G	19.849	
9	Bilinmeyen H	21.322	
10	Bilinmeyen I	22.416	
11	Bilinmeyen J	24.316	

Tablo 26'nın devamı

12	Bilinmeyen K	24.669	
13	Bilinmeyen L	25.073	
14	Bilinmeyen M	31.705	
15	Bilinmeyen N	34.656	

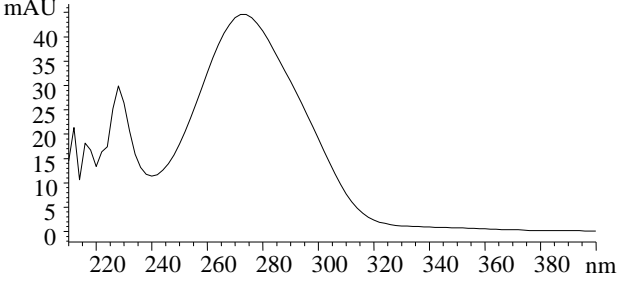
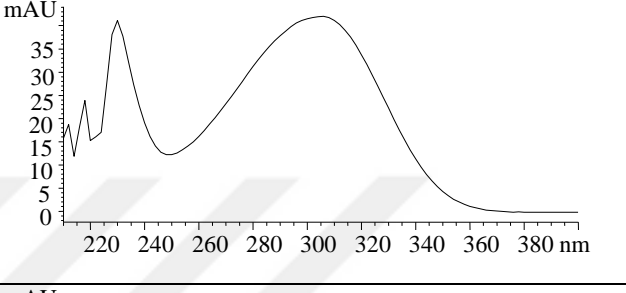
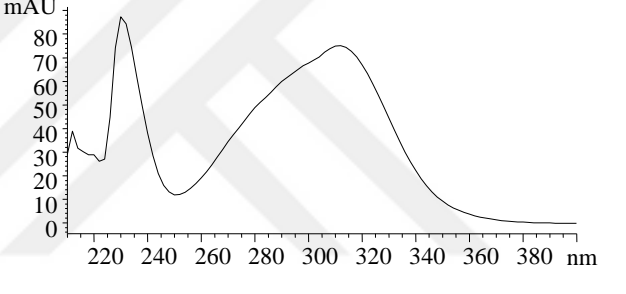
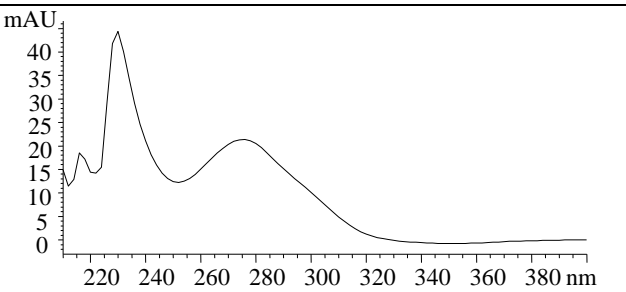
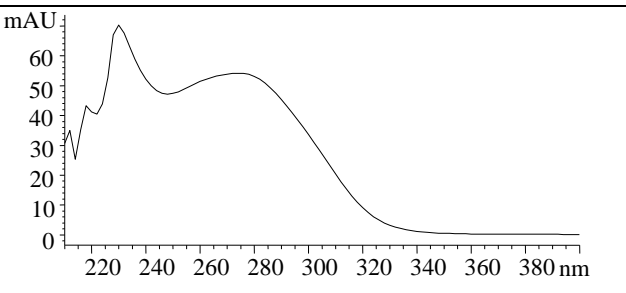


Şekil 58. Altınbaş Klasik Siyah Çay (ALS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Tablo 27. Altınbaş Klasik Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

	Bileşik Adı	RT (dk)	ALS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	6.599	
2	Bilinmeyen A	10.981	

Tablo 27'nin devamı

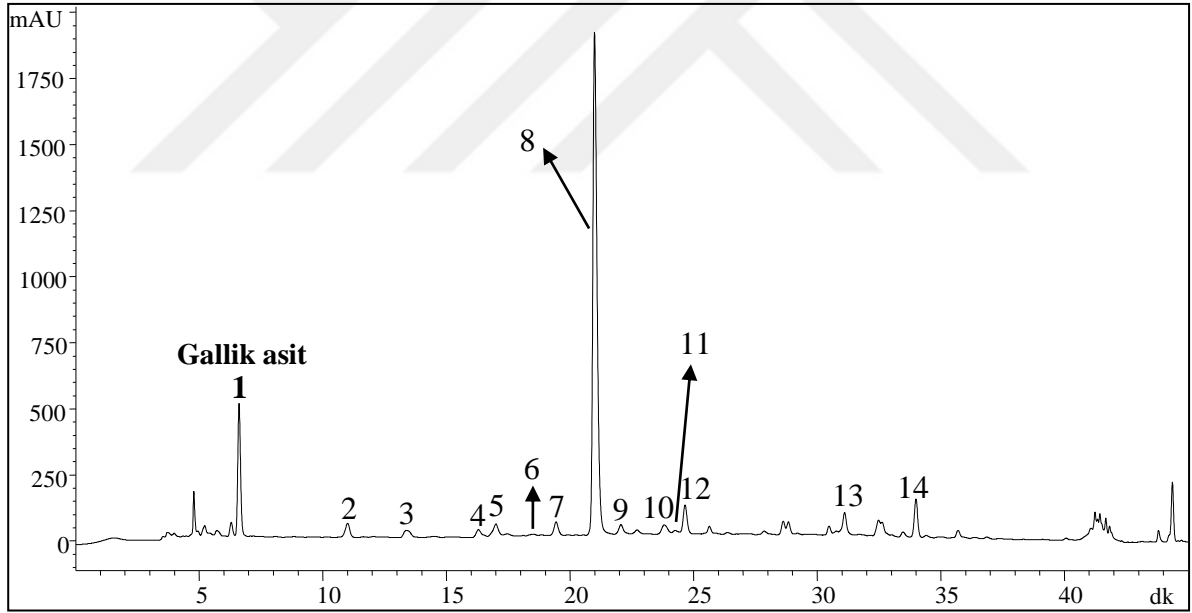
3	Bilinmeyen B	13.298	
4	Bilinmeyen C	16.262	
5	Bilinmeyen D	16.958	
6	Bilinmeyen E	18.495	
7	Bilinmeyen F	19.422	

Tablo 27'nin devamı

8	Bilinmeyen G	20.947	
9	Bilinmeyen H	22.045	
10	Bilinmeyen I	23.872	
11	Bilinmeyen J	24.235	
12	Bilinmeyen K	24.639	

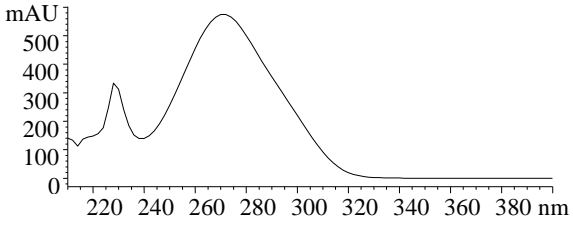
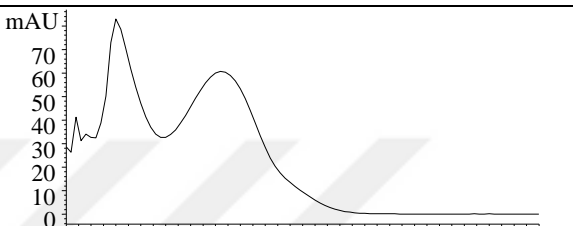
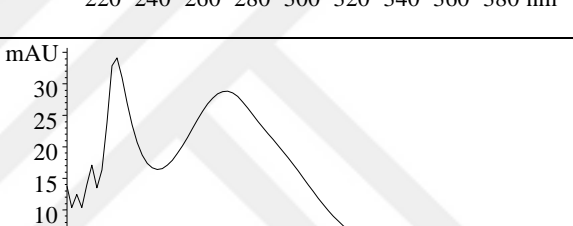
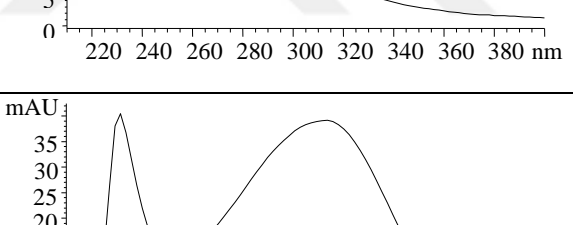
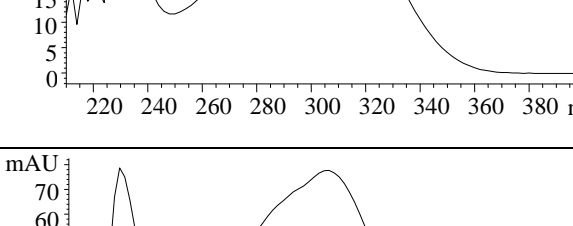
Tablo 27'nin devamı

13	Bilinmeyen L	31.112	
14	Bilinmeyen M	33.999	



Şekil 59. Organik Hemşin Siyah Çay (OHS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Tablo 28. Organik Hemşin Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

	Bileşik Adı	RT (dk)	OHS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	6.612	
2	Bilinmeyen A	11.007	
3	Bilinmeyen B	13.377	
4	Bilinmeyen C	16.298	
5	Bilinmeyen D	17.001	

Tablo 28'in devamı

6	Bilinmeyen E	18.523	
7	Bilinmeyen F	19.436	
8	Bilinmeyen G	20.994	
9	Bilinmeyen H	22.062	
10	Bilinmeyen I	23.814	

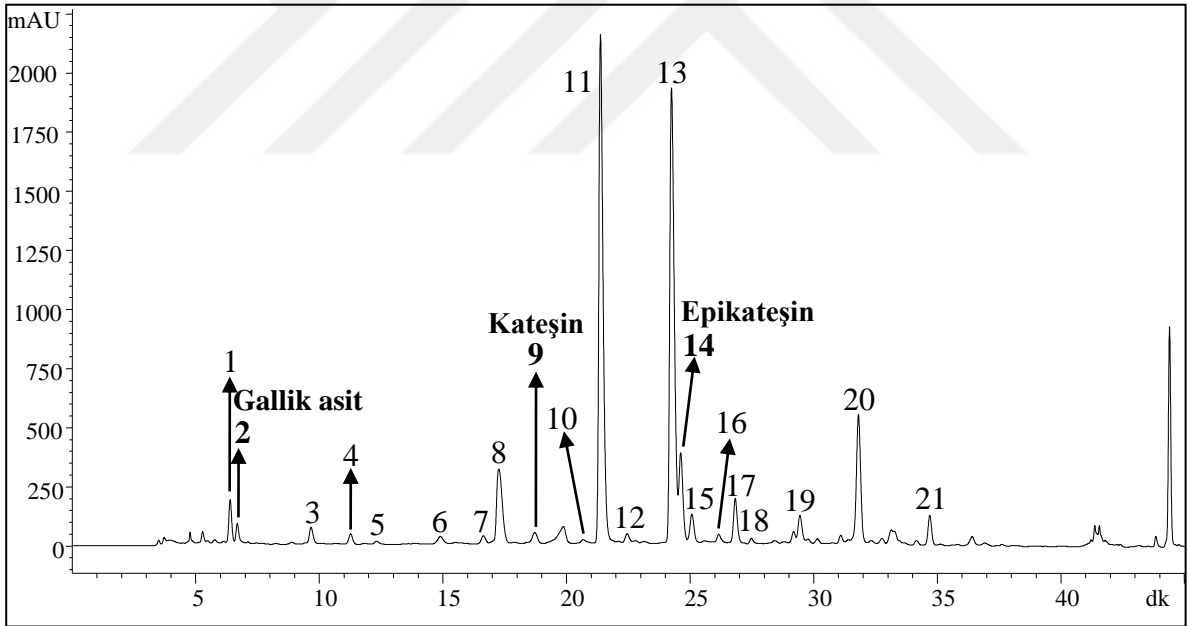
Tablo 28'in devamı

11	Bilinmeyen J	24.255	
12	Bilinmeyen K	24.656	
13	Bilinmeyen L	31.107	
14	Bilinmeyen M	33.993	

Antik ve Organik Zümrüt yeşil çay ekstraktlarının HPLC-DAD analizi ile elde edilen kromatogramları sırasıyla Şekil 60 ve 61'de gösterilirken, Tablo 29 ve 30'da ise kromatogramlarda numaralandırılmış pikler için tutulma süreleri, spektral verileri ve tanımlanan bileşik adları gösterilmiştir. Buna göre her iki yeşil çay numunesinde 2 (gallik asit) ve 9 (kateşin) nolu fenoliklerin yapısı aydınlatılmıştır. Ayrıca 14 nolu bileşiğin, standart yürütülmesi sonucu tutulma zamanı ve spektruma göre epikateşin olduğu tespit edildi (Şekil 24, B). Literatürdeki verilere göre Antik ve Organik Zümrüt yeşil çay ekstraktlarındaki 1 (Bilinmeyen A) nolu bileşiğin theogallin, 4 (Bilinmeyen C) nolu bileşiğin ise teobromin olabileceği söylenebilir (Yao vd., 2004). Bölüm 3.2'de kateşinler

ve kafein analiz sonuçlarına ve literatüre göre her iki yeşil çay numunesinde de 11 (Bilinmeyen I) nolu başlıca bileşenin kafein olabileceği söylenebilir.

Her iki yeşil çay numunesinde de 3 (Bilinmeyen B), 6 (Bilinmeyen E), 8 (Bilinmeyen G), 13 (Bilinmeyen K), 17 (Bilinmeyen N), 18 (Bilinmeyen O), 19 (Bilinmeyen P) ve 20 (Bilinmeyen R) numaralı bileşikler yeşil çay kateşinlerinin ve gallatlarının spektral karakteristiği olup, 21 (Bilinmeyen S) nolu bileşik ise 266 ve 348 nm dalga boylarında göstermiş olduğu spektrum ile kaempferol glikozitleri ile benzerlik göstermektedir (Yao vd., 2004; Lin vd., 2014; García vd., 2017). Aynı şekilde maksimum absorpsiyon dalga boyları yaklaşık 240, 310 ve 325 nm olan 5 (Bilinmeyen D), 7 (Bilinmeyen F), 10 (Bilinmeyen H), 12 (Bilinmeyen J) ve 15 (Bilinmeyen L) nolu bileşiklerin spektrumları da literatürdeki sinamik asit ve sinamik asit türevlerinin (klorojenik asit, *p*-kumarik asit gibi) spektrumlarıyla benzer olup, dolayısıyla bu bileşiklerin sinamik asit türevi olabilecekleri söylenebilir.



Şekil 60. Antik Yeşil Çay (AYS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Tablo 29. Antik Yeşil Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	AYS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Bilinmeyen A	6.396	
2	Gallik asit	6.684	
3	Bilinmeyen B	9.671	
4	Bilinmeyen C	11.268	
5	Bilinmeyen D	12.318	

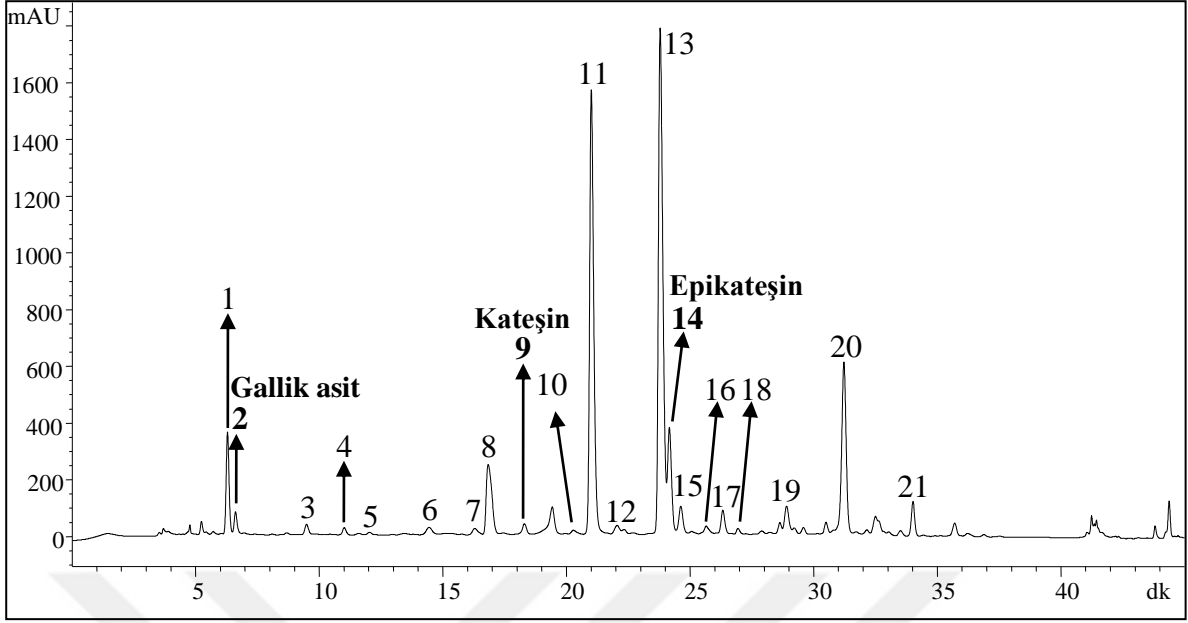
Tablo 29'un devamı

6	Bilinmeyen E	14.898	
7	Bilinmeyen F	16.646	
8	Bilinmeyen G	17.261	
9	Kateşin	18.715	
10	Bilinmeyen H	20.674	

Tablo 29'un devamı

11	Bilinmeyen I	21.378	
12	Bilinmeyen J	22.455	
13	Bilinmeyen K	24.251	
14	Epikateşin	24.620	
15	Bilinmeyen L	25.077	
16	Bilinmeyen M	26.162	

17	Bilinmeyen N	26.828	
18	Bilinmeyen O	27.484	
19	Bilinmeyen P	29.442	
20	Bilinmeyen R	31.810	
21	Bilinmeyen S	34.700	



Şekil 61. Organik Zümrüt Yeşil Çay (OYS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Tablo 30. Organik Zümrüt Yeşil Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

	Bileşik Adı	RT (dk)	OYS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Bilinmeyen A	6.294	
2	Gallik asit	6.616	
3	Bilinmeyen B	9.486	

Tablo 30'un devamı

4	Bilinmeyen C	11.017	
5	Bilinmeyen D	12.034	
6	Bilinmeyen E	14.444	
7	Bilinmeyen F	16.294	
8	Bilinmeyen G	16.832	
9	Kateşin	18.304	

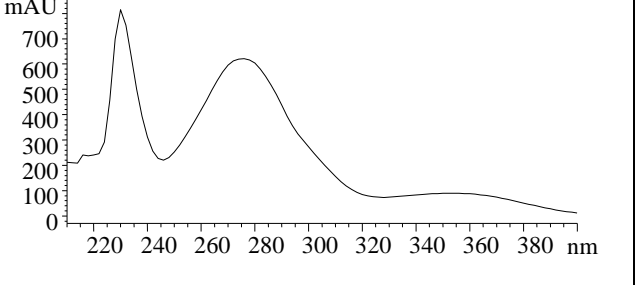
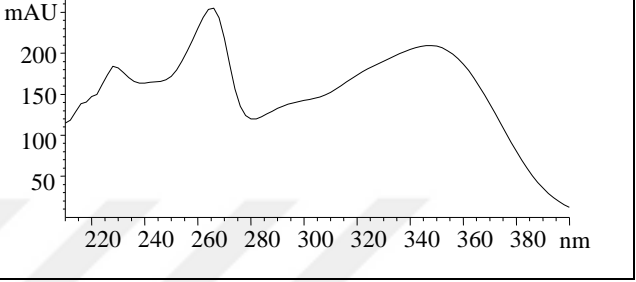
Tablo 30'un devamı

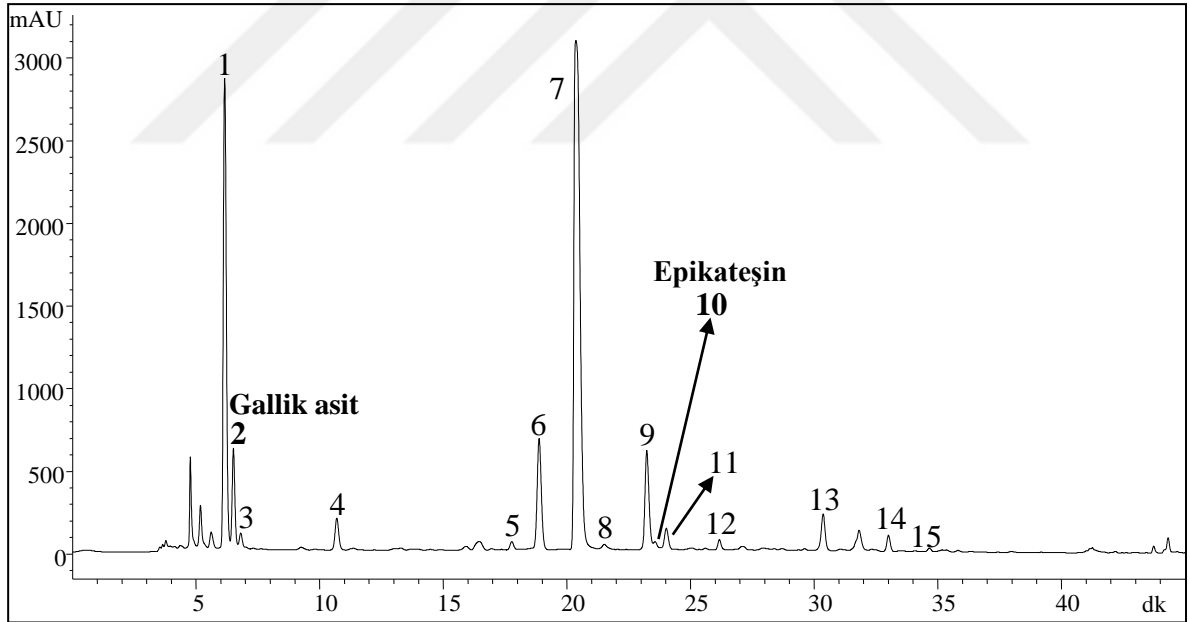
10	Bilinmeyen H	20.280	
11	Bilinmeyen I	21.009	
12	Bilinmeyen J	22.054	
13	Bilinmeyen K	23.792	
14	Epikateşin	24.162	

Tablo 30'un devamı

15	Bilinmeyen L	24.628	
16	Bilinmeyen M	25.658	
17	Bilinmeyen N	26.325	
18	Bilinmeyen O	26.941	
19	Bilinmeyen P	28.904	

Tablo 30'un devamı

20	Bilinmeyen R	31.222	
21	Bilinmeyen S	34.004	



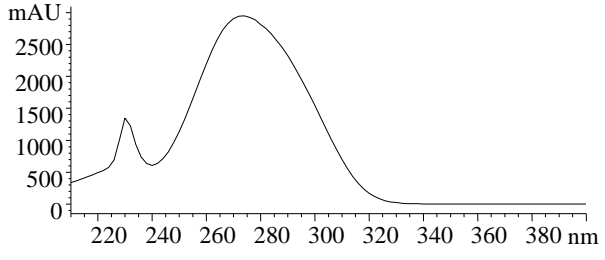
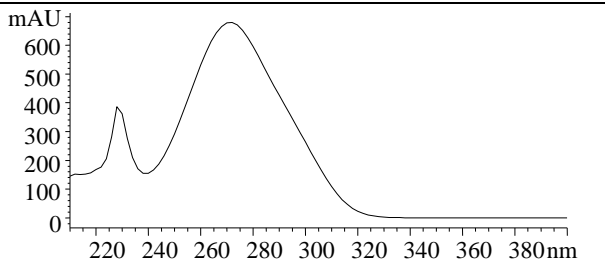
Şekil 62. Beyaz Çay (BÇS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Beyaz çay ekstraktının HPLC-DAD analizi ile elde edilen kromatogramı Şekil 62'de, bu kromatogramlarda numaralandırılmış pikler için tutulma süreleri, spektral verileri ve tanımlanan bileşik adları ise Tablo 31'de gösterilmiştir. Buna göre beyaz çay ekstraktında tanımlanan fenolik bileşik sadece 2 (gallik asit) nolu bileşiktir. Ayrıca 10 nolu

bileşik standart yürütülmesi sonucu tutulma zamanı ve spektruma göre (Şekil 24, B) epikateşin olduğu tespit edildi. Literatürdeki verilere göre beyaz çay ekstraktlarındaki 1 (Bilinmeyen A) nolu fenolik theogallin ve 4 (Bilinmeyen C) nolu bileşik ise teobromin olabilir (Yao vd., 2004; Tan vd., 2017). Bölüm 3.2’de kateşinler ve kafein analiz sonuçlarına ve literatüre göre beyaz çay numunesinde 7 (Bilinmeyen F) nolu başlıca bileşenin kafein olabileceği söylenebilir.

3 (Bilinmeyen B) numaralı bileşik gallik asit spektrumu ile benzerlik gösterdiğinden bu bileşiğin bir gallik asit türevi olabileceği söylenebilir. 230 ve 278 nm maksimum absorpsiyon dalga boyunda spektrum veren 5 (Bilinmeyen D), 6 (Bilinmeyen E), 9 (Bilinmeyen H), 12 (Bilinmeyen J), ve 13 (Bilinmeyen K) numaralı bileşikler beyaz çay kateşinlerinin ve gallatlarının spektral karakteristiğidir. 14 (Bilinmeyen L) ve 15 (Bilinmeyen M) nolu bileşikler ise 266 ve 348 nm dalga boylarında göstermiş olduğu spektrum ile kaempferol glikozitleri ile benzerlik göstermektedir (Yao vd., 2004; Lin vd., 2014; García vd., 2017). Aynı şekilde maksimum absorpsiyon dalga boyları yaklaşık 230 ve 310 nm olan 8 (Bilinmeyen G) ve 11 (Bilinmeyen I) numaralı bileşiklerin spektrumları da literatürdeki sinamik asit ve sinamik asit türevlerinin (*p*-kumarik asit gibi) spektrumlarıyla benzer olup, dolayısıyla bu bileşiklerin sinamik asit türevi olabilecekleri söylenebilir.

Tablo 31. Beyaz Çay ekstraktındaki bileşikler, RT’ leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	BÇS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Bilinmeyen A	6.161	
2	Gallik asit	6.513	

Tablo 31'in devamı

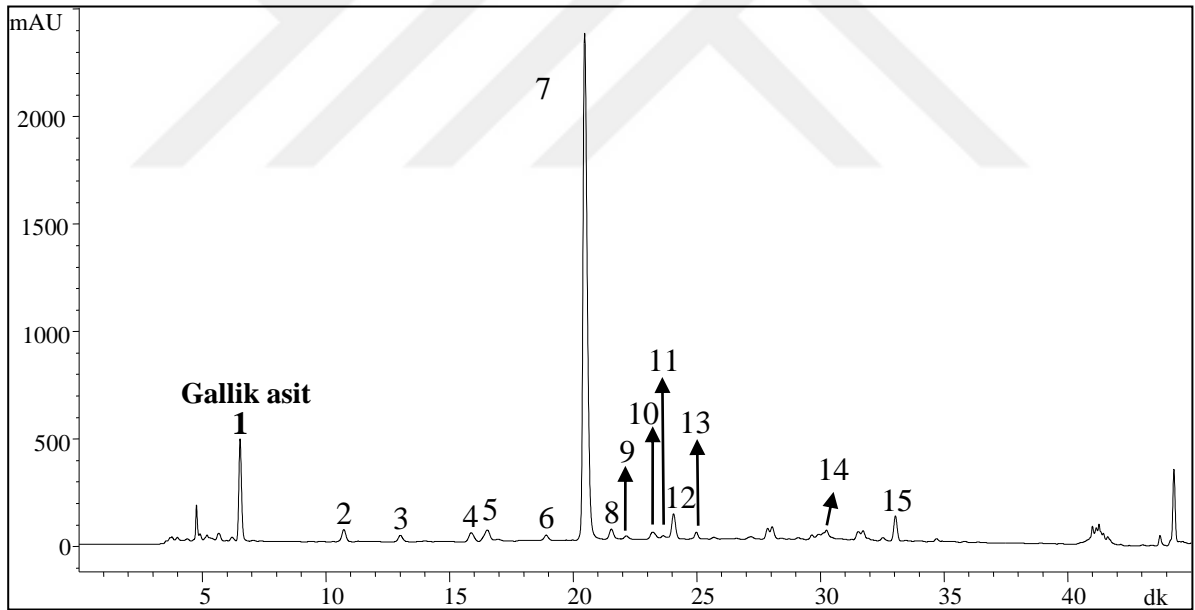
3	Bilinmeyen B	6.807	
4	Bilinmeyen C	10.692	
5	Bilinmeyen D	17.771	
6	Bilinmeyen E	18.877	
7	Bilinmeyen F	20.365	

Tablo 31'in devamı

8	Bilinmeyen G	21.513	
9	Bilinmeyen H	23.234	
10	Epikateşin	23.566	
11	Bilinmeyen I	24.019	
12	Bilinmeyen J	26.169	
13	Bilinmeyen K	30.363	

Tablo 31'in devamı

14	Bilinmeyen L	33.010	
15	Bilinmeyen M	34.663	



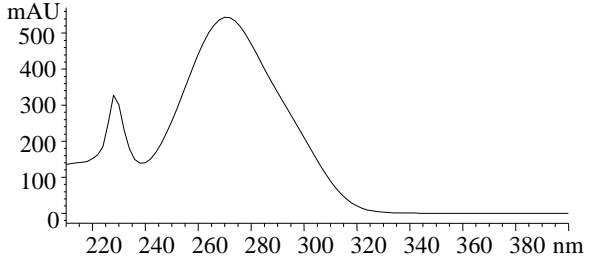
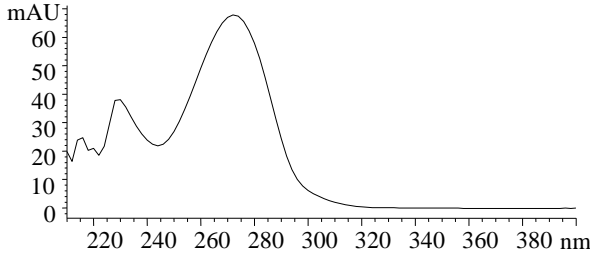
Şekil 63. Çay Lifi (ÇLS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

Şekil 63'de çay lifi ekstraktının HPLC-DAD analizi ile elde edilen kromatogramı, Tablo 32'de ise bu kromatogramlarda numaralandırılmış pikler için tutulma süreleri, spektral verileri ve tanımlanan bileşik adları verilmiştir. Buna göre çay lifi ekstraktında tanımlanan fenolik bileşik sadece 1 (gallik asit) nolu bileşiktir. 7 (Bilinmeyen F) nolu

başlıca bileşen Bölüm 3.2’de kateşinler ve kafein analiz sonuçlarına ve literatüre göre kafein olabilir.

230 ve 280 nm maksimum absorpsiyon dalga boyunda spektrum veren 6 (Bilinmeyen E), 9 (Bilinmeyen H), 10 (Bilinmeyen I) ve 11 (Bilinmeyen J) numaralı bileşikler çay kateşinlerinin ve gallatlarının spektral karakteristiği olduğundan bu bileşiklerin kateşinler ile benzer yapıda olduğu söylenebilir. Ayrıca maksimum absorpsiyon dalga boyları yaklaşık 230 ve 310 nm olan 4 (Bilinmeyen C), 5 (Bilinmeyen D), 8 (Bilinmeyen G) ve 12 (Bilinmeyen K) numaralı bileşiklerin spektrumları da literatürdeki sinamik asit ve sinamik asit türevlerinin (*p*-kumarik asit gibi) spektrumlarıyla benzer olup, dolayısıyla bu bileşiklerin sinamik asit türevi olabilecekleri söylenebilir. Son olarak 14 (Bilinmeyen M) nolu bileşik 256 ve 354 nm maksimum dalga boylarında gösterdiği spektrum ile kuersetin glikozitleri ile 15 (Bilinmeyen N) nolu bileşik ise 266 ve 348 nm dalga boylarında göstermiş olduğu spektrum ile kaempferol glikozitleri ile benzerlik göstermektedir (Yao vd., 2004; Lin vd., 2014; García vd., 2017).

Tablo 32. Çay Lifi ekstraktındaki bileşikler, RT’ leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	ÇLS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	6.528	
2	Bilinmeyen A	10.728	

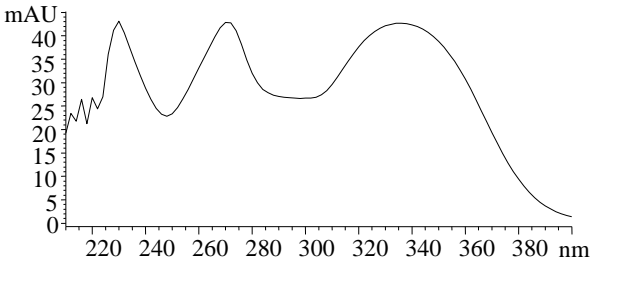
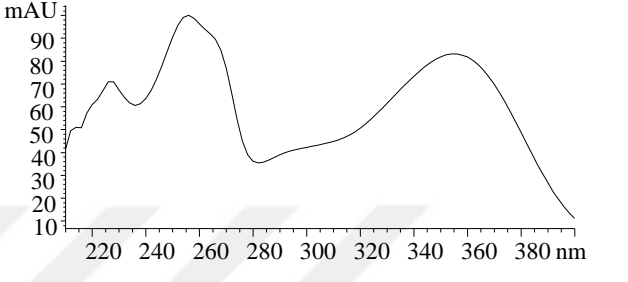
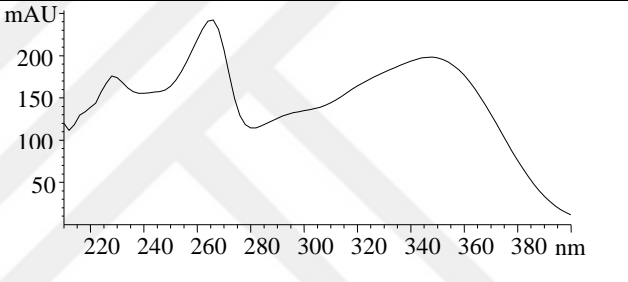
Tablo 32'nin devamı

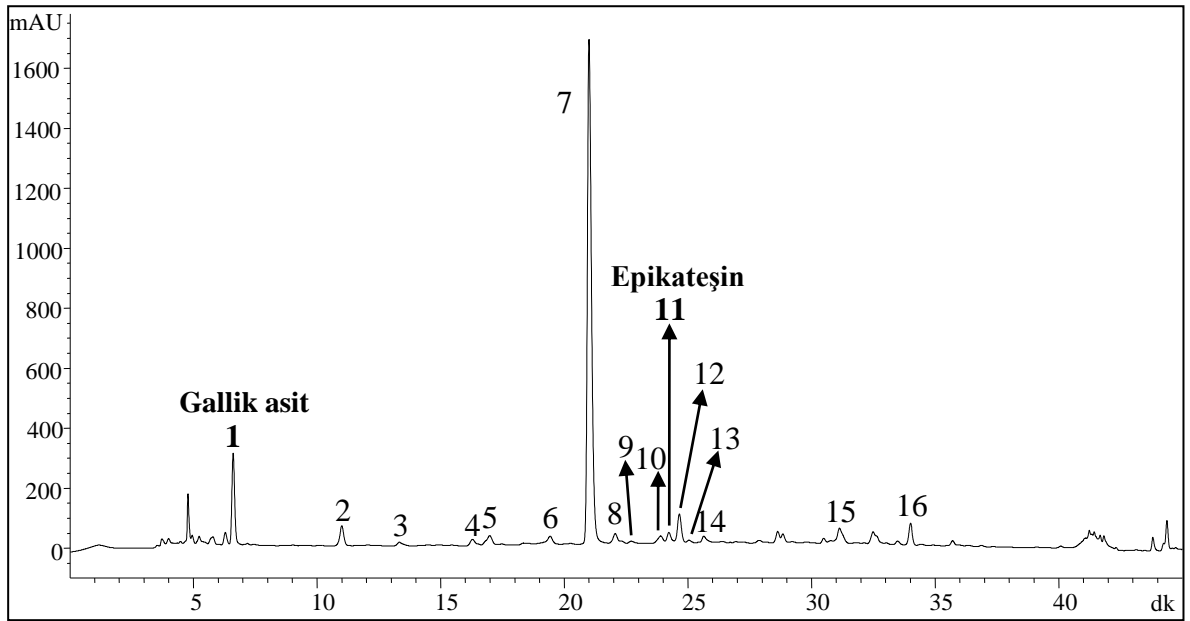
3	Bilinmeyen B	13.010	
4	Bilinmeyen C	15.876	
5	Bilinmeyen D	16.528	
6	Bilinmeyen E	18.910	
7	Bilinmeyen F	20.462	

Tablo 32'nin devamı

8	Bilinmeyen G	21.545	
9	Bilinmeyen H	22.153	
10	Bilinmeyen I	23.221	
11	Bilinmeyen J	23.642	
12	Bilinmeyen K	24.058	

Tablo 32'nin devamı

13	Bilinmeyen L	24.980	
14	Bilinmeyen M	30.245	
15	Bilinmeyen N	33.036	



Şekil 64. Çay Çöpü (ÇÇS) ekstraktının DAD-280 nm'deki kromatogramı

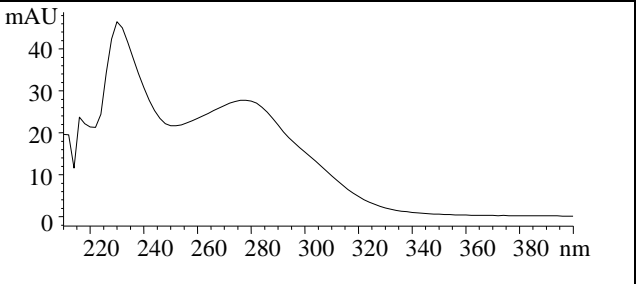
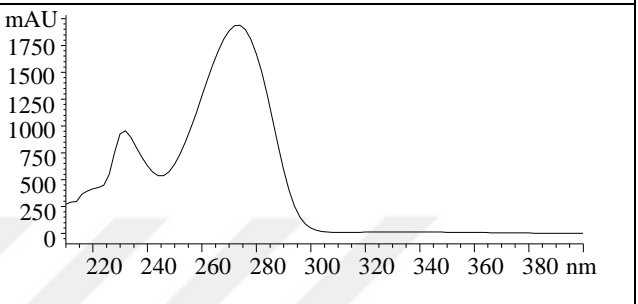
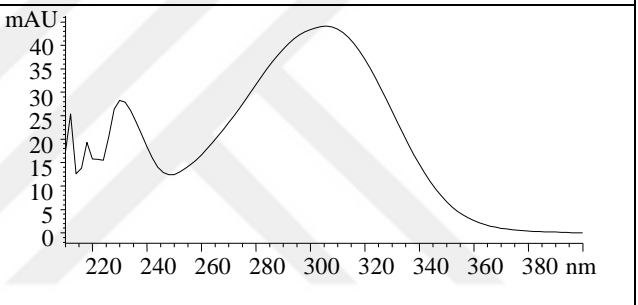
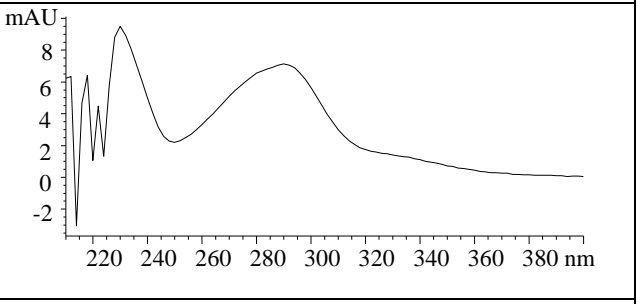
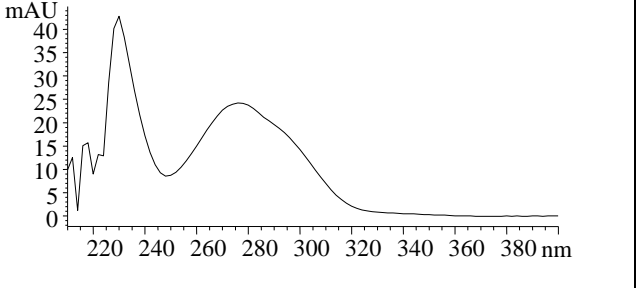
Şekil 64’de çay çöpü ekstraktının HPLC-DAD analizi ile elde edilen kromatogramı, Tablo 33’de ise bu kromatogramlarda numaralandırılmış pikler için tutulma süreleri, spektral verileri ve tanımlanan bileşik adları verilmiştir. Buna göre çay çöpü ekstraktında tanımlanan fenolik bileşik sadece 1 (gallik asit) nolu bileşiktir. 7 (Bilinmeyen F) nolu başlıca bileşen Bölüm 3.2’de kateşinler ve kafein analiz sonuçlarına ve literatüre göre kafein olabilir. Ayrıca 11 nolu bileşik standart yürütülmesi sonucu tutulma zamanı ve spektruma göre epikateşin olduğu tespit edildi (Şekil 24, B).

6 (Bilinmeyen E), 9 (Bilinmeyen H), 10 (Bilinmeyen I) ve 13 (Bilinmeyen K) numaralı bileşiklerin spektrumuna bakıldığında 230 ve 280 nm maksimum absorpsiyon dalga boyunda spektrum vermiştir. Bu spektrumlar çay kateşinlerinin ve gallatlarının spektral karakteristiği olduğundan bu bileşiklerin kateşinler ile benzer yapıda olduğu söylenebilir. Ayrıca maksimum absorpsiyon dalga boyları yaklaşık 230 ve 310 nm olan 4 (Bilinmeyen C), 5 (Bilinmeyen D), 8 (Bilinmeyen G) ve 12 (Bilinmeyen J) numaralı bileşiklerin spektrumları da literatürdeki sinamik asit ve sinamik asit türevlerinin (*p*-kumarik asit gibi) spektrumlarıyla benzer olduğundan dolayısıyla bu bileşiklerin sinamik asit türevi olabilecekleri söylenebilir. Son olarak 15 (Bilinmeyen M) nolu bileşik 256 ve 354 nm maksimum dalga boylarında gösterdiği spektrum ile kuersetin glikozitleri ile 16 (Bilinmeyen N) nolu bileşik ise 266 ve 348 nm dalga boylarında göstermiş olduğu spektrum ile kaempferol glikozitleri ile benzerlik göstermektedir (Yao vd., 2004; Lin vd., 2014; García vd., 2017).

Tablo 33. Çay Çöpü ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	ÇÇS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	6.609	
2	Bilinmeyen A	11.005	
3	Bilinmeyen B	13.329	
4	Bilinmeyen C	16.290	
5	Bilinmeyen D	16.998	

Tablo 33'ün devamı

6	Bilinmeyen E	19.428	
7	Bilinmeyen F	21.004	
8	Bilinmeyen G	22.064	
9	Bilinmeyen H	22.709	
10	Bilinmeyen I	23.900	

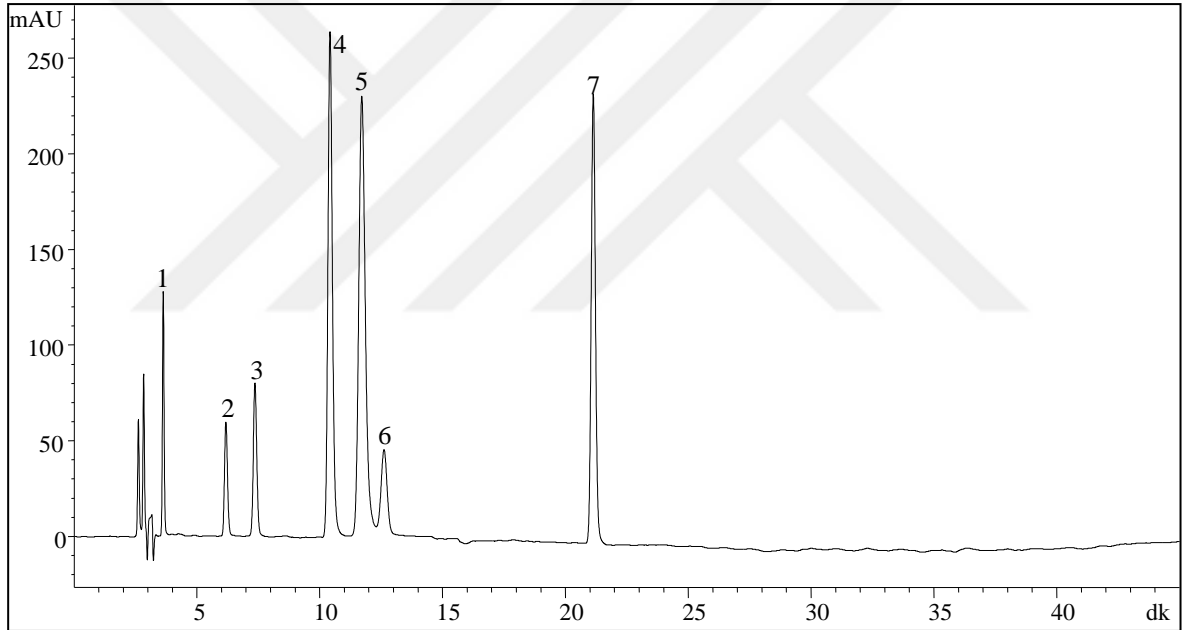
Tablo 33'ün devamı

11	Epikateşin	24.229	
12	Bilinmeyen J	24.658	
13	Bilinmeyen K	25.048	
14	Bilinmeyen L	25.649	
15	Bilinmeyen M	31.133	
16	Bilinmeyen N	34.005	

3.2. HPLC-DAD-UV ile Kateşinler, Kafein ve Gallik Asit Analizi

3.2.1. Kateşinler, Kafein ve Gallik Asit Standartlarının HPLC-DAD-UV ile Analizi

Çayda bulunan gallik asit, kafein ve kateşin standartlarını (gallik asit, (-)-epigallokateşin, (+)-kateşin, kafein, (-)-epigallokateşin gallat, (-)-epikateşin, (-)-epikateşin gallat) içeren karışımın yürütülmesiyle elde edilen 278 nm'deki DAD kromatogramları Şekil 65' de verilmiştir. 45 dakikada 7 standart bileşik birbirinden ayrılmıştır. Kromatogramlarda yer alan 7 standart bileşiğin tutulma zamanları (RT: retention time) Tablo 34'de verilmiştir.

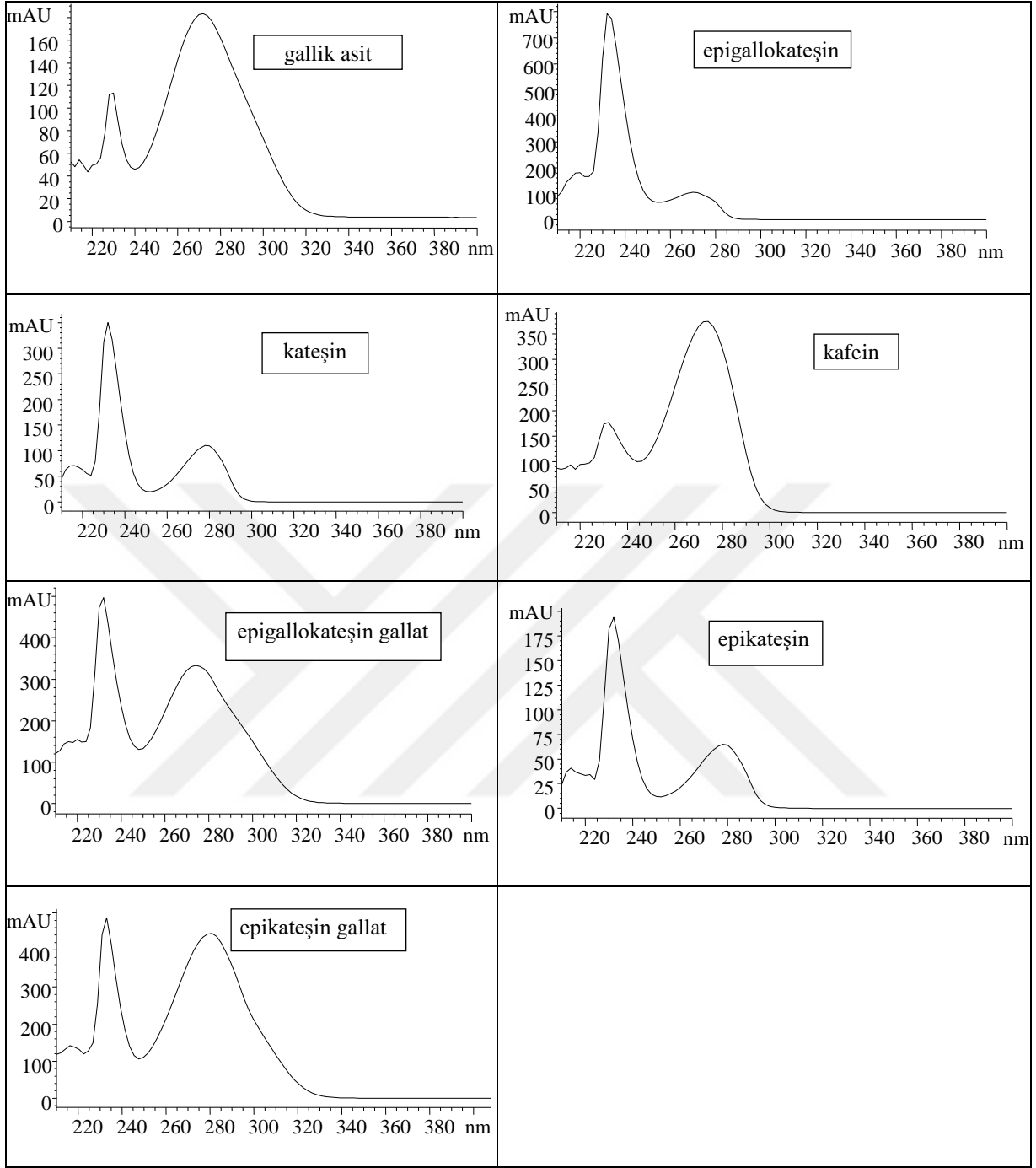


Şekil 65. 7 standart bileşenin karışımının 278 nm'deki HPLC-DAD kromatogramı (1. gallik asit, 2. (-)-epigallokateşin, 3. (+)-kateşin, 4. kafein, 5. (-)-epigallokateşin gallat, 6. (-)-epikateşin, 7. (-)-epikateşin gallat).

Tablo 34. HPLC’de yürütülen 7 standart bileşen karışımının DAD-278 nm’deki tutulma zamanları

No	Bileşik adı	Ahkonma zamanı (dk)
1	Gallik asit	3,630
2	(-)-Epigallokateşin (EGC)	6,186
3	(+)-Kateşin (C)	7,369
4	Kafein	10,422
5	(-)-Epigallokateşin gallat (EGCG)	11,713
6	(-)-Epikateşin (EC)	12,620
7	(-)-Epikateşin gallat (ECG)	21,138

Kullanılan DAD ve bağılı bulunduğu HPLC sisteminin ChemStatiton programı sayesinde her bir standart pikin tutulma zamanları göz önünde tutularak, spektrumları alınmış, daha sonra siyah, beyaz, yeşil çay, çay çöpü ve çay lifi ekstraktlarının yürütülmesiyle elde edilen kromatogramlarda her bir pikin ait olduğu bileşiğin belirlenebilmesinde referans olarak kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar süresince kullanılan 7 standart bileşiğe ait DAD spektrumları Şekil 66’da verilmiştir.



Şekil 66. Analizlerde kullanılan 7 standart bileşenin (karışım C) spektrumları

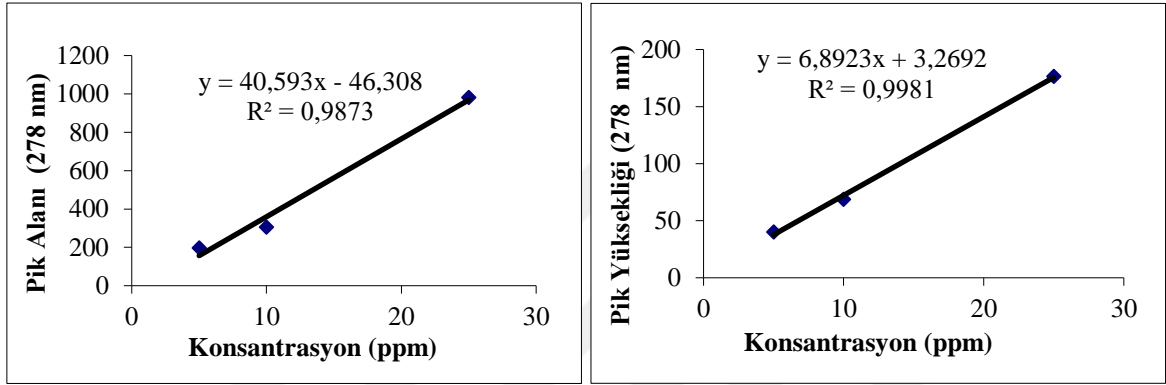
3.2.2. Kateşinler, Kafein ve Gallik Asit Standartlarının Kalibrasyon Eğrileri

Çalışmada kullanılan yöntem ISO-14502-2'ye göre çay ürünüde kateşin bileşiklerinin analizine göre yapılmıştır.

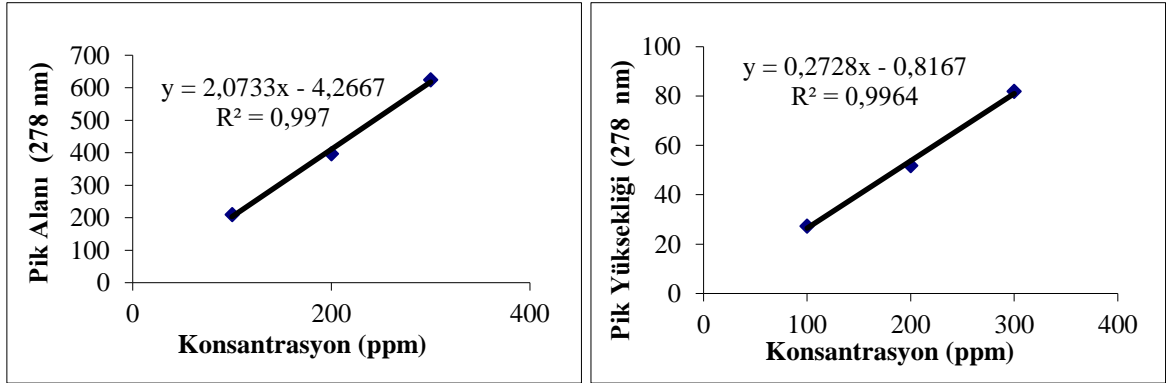
Tablo 13'e göre hazırlanan standart karışımların ISO-14502-2 yöntemine göre yürütülmesiyle DAD 278 nm'de elde edilen kromatogramlardaki pik alanları ve pik

yükseklikleri konsantrasyona karşı Microsoft Excel programında grafiğe geçirildi (Şekil 67-73). Bu grafikler, kullanılan 7 tane standardın test edilen konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını ortaya koymak için hazırlanmıştır. Tüm kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları 0.994 ile test edilen konsantrasyon aralıkları üzerinde doğrusaldı.

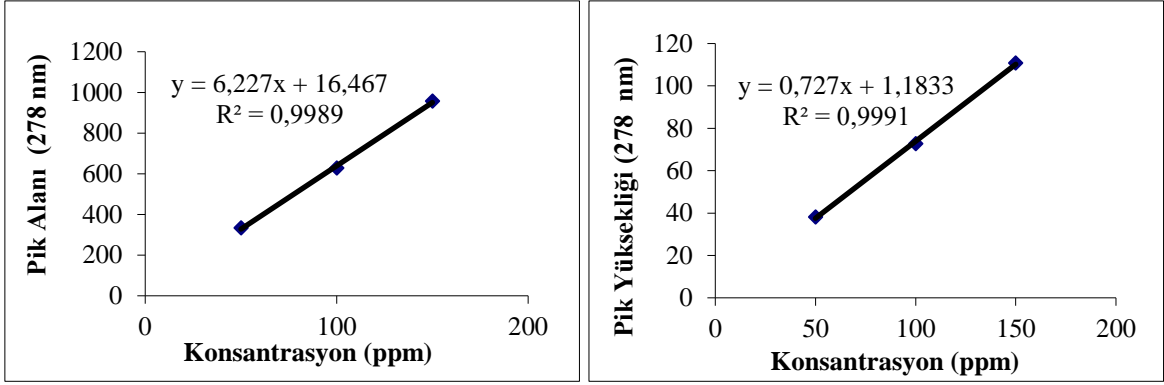
Ayrıca kantitatif analizde numunelerdeki bileşiklere ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş entegre alanlar ve standart maddelerin ara stok çözeltileri ile hazırlanmış bu kalibrasyon grafiklerinden yararlanılmıştır.



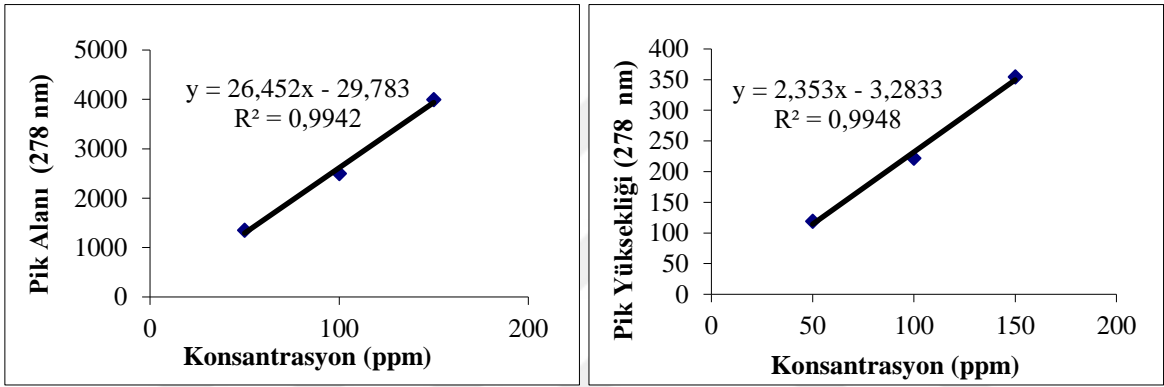
Şekil 67. Gallik asitin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



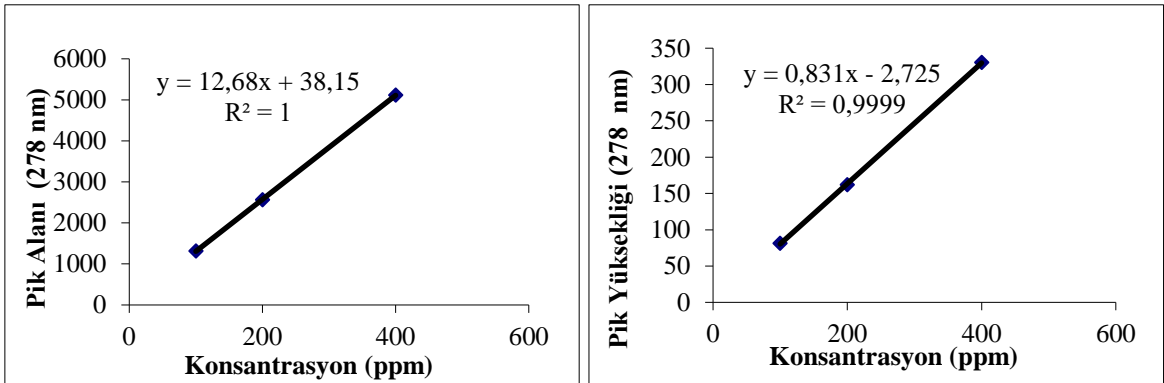
Şekil 68. (-)-Epigallokateşinin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



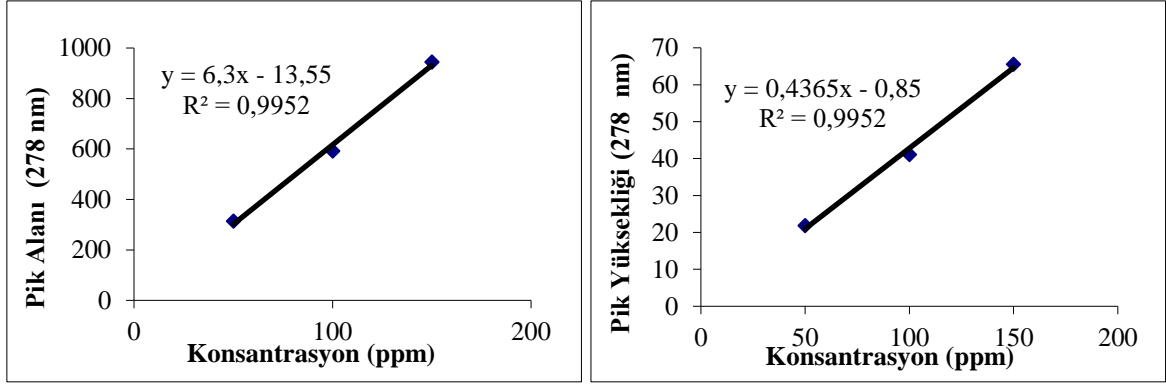
Şekil 69. (+)-Kateşinin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



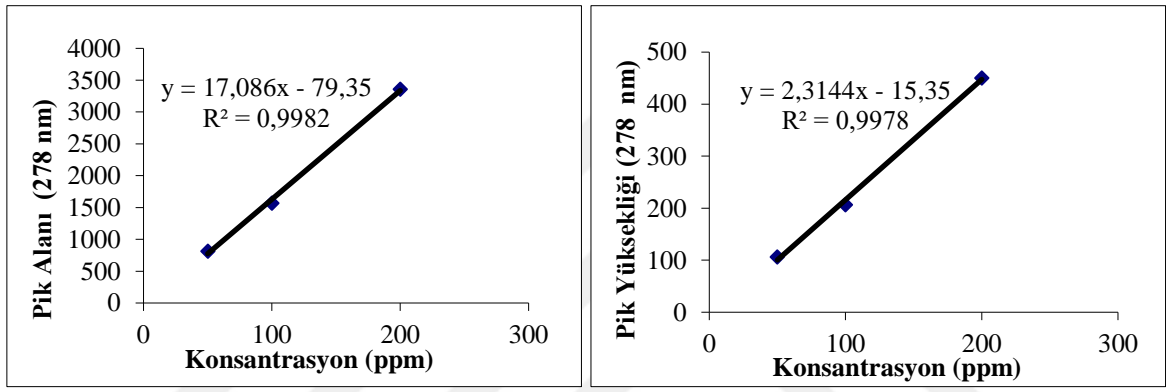
Şekil 70. Kafeinin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



Şekil 71. (-)-Epigallokateşin gallas DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



Şekil 72. (-)-Epikateşinin DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri



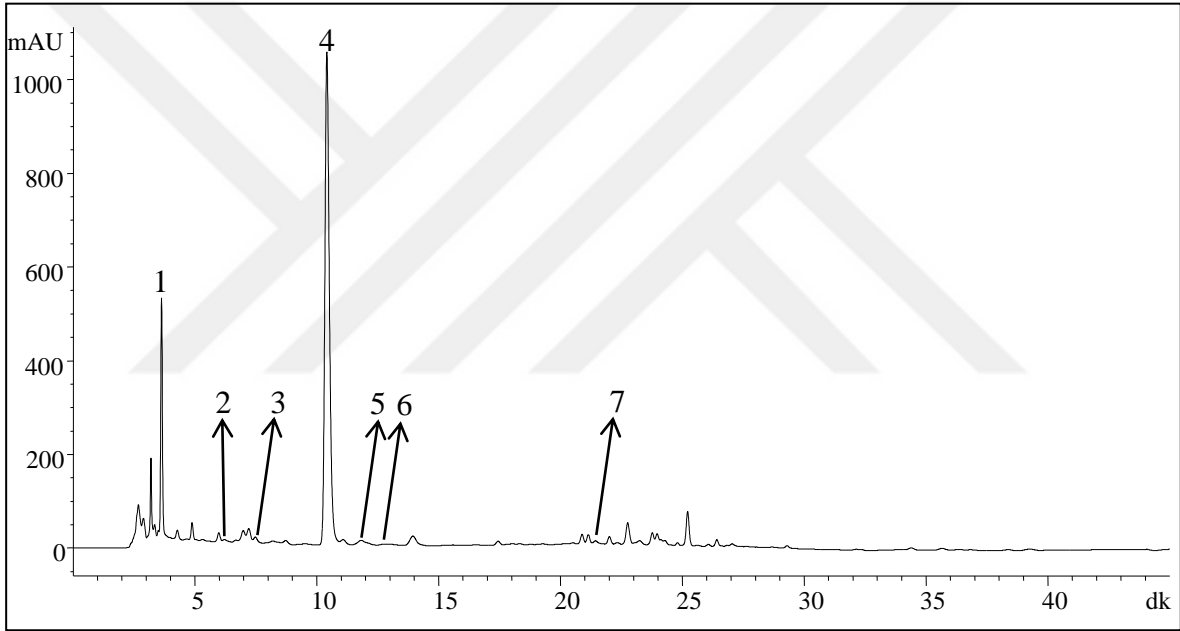
Şekil 73. (-)-Epikateşin gallat DAD-278 nm'deki konsantrasyon-pik alanı ve konsantrasyon-pik yüksekliği grafikleri

3.2.3. Siyah Çay, Beyaz Çay, Yeşil Çay, Çay Lifi ve Çay Çöpü Ekstraktlarında HPLC-DAD-UV ile Kateşinler, Kafein ve Gallik Asitin Eş Zamanlı Analizi

Bu çalışmada 3 siyah çay, 2 yeşil çay, 1 beyaz çay, 1 çay lifi ve 1 çay çöpü ekstraktlarında tek tek kateşinler, kafein ve gallik asidin eşzamanlı olarak ayrılması, tanımlanması ve miktar analizi HPLC-DAD metodu ile yapılmıştır.

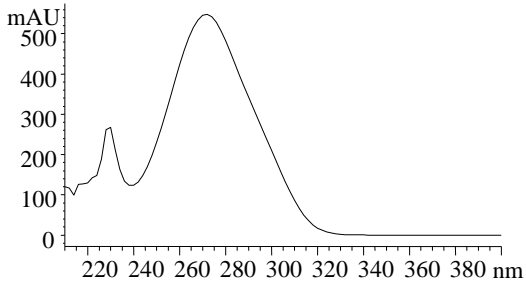
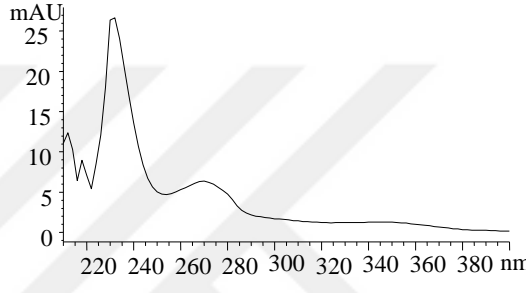
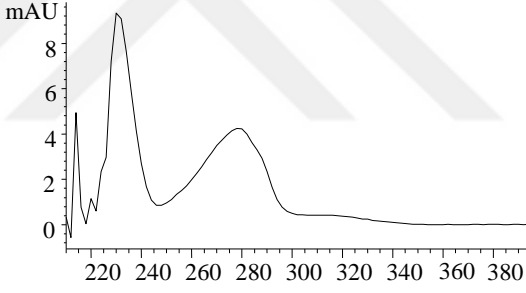
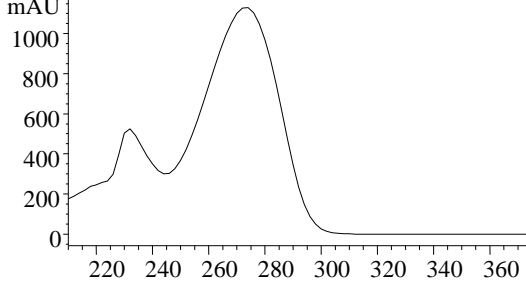
Şekil 74'de 2. Nevi siyah çay, Şekil 75'de Altınbaş klasik siyah çay, Şekil 76'da Organik Hemşin siyah çay, Şekil 77'de Antik yeşil çay, Şekil 78'de Organik Zümrüt yeşil çay, Şekil 79'da beyaz çay, Şekil 80'de çay lifi ve Şekil 81'de çay çöpü ekstraktlarına ait HPLC-DAD ile elde edilen kromatogramlar verilmiştir. Tablo 35 ile 42 arasında ise yukarıdaki numune sırasına göre kromatogramlarda numaralandırılmış pikler için tutulma süreleri, spektral verileri ve tanımlanan bileşik adları verilmiştir. Tablo 43'de ise numunelerde tespit edilen kateşinler, kafein ve gallik asitin kantitatif miktarları verilmiştir.

Tablo 43'e göre, en yüksek gallik asit miktarı siyah çaylarda en düşük miktar ise yeşil çaylarda tespit edildi. Çünkü fermantasyon süreci siyah çaylardaki gallik asit düzeylerini belirgin bir şekilde yükseltmiştir. Bunun yanı sıra hiçbir fermantasyona tabi olmadan doğrudan taze çay yapraklarının kurutulması ve buhara tabi tutulmasıyla elde edilen yeşil çay numuneleri ise daha yüksek seviyede epigallokateşin, kateşin, epigallokateşin gallat, epigallokateşin ve epikateşin gallat içerir. Çayda en bol bulunan alkaloid olan kafein beyaz çay numunesinde en fazla miktarda tespit edildi. Çay lifi ve çay çözümlerinde ise gallik asit miktarı yeşil çaylara göre daha fazla olup içerdiği kateşinler 41-180 ppm ve kafein miktarları ise 697-923 ppm arasında değişmektedir.

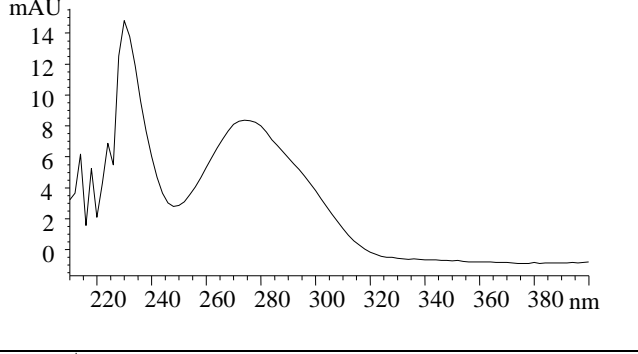
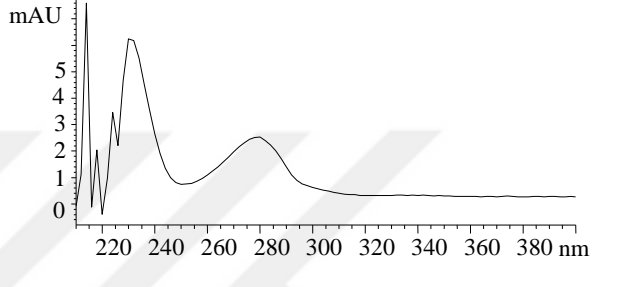
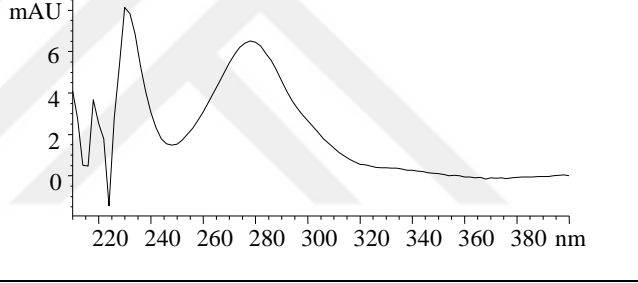


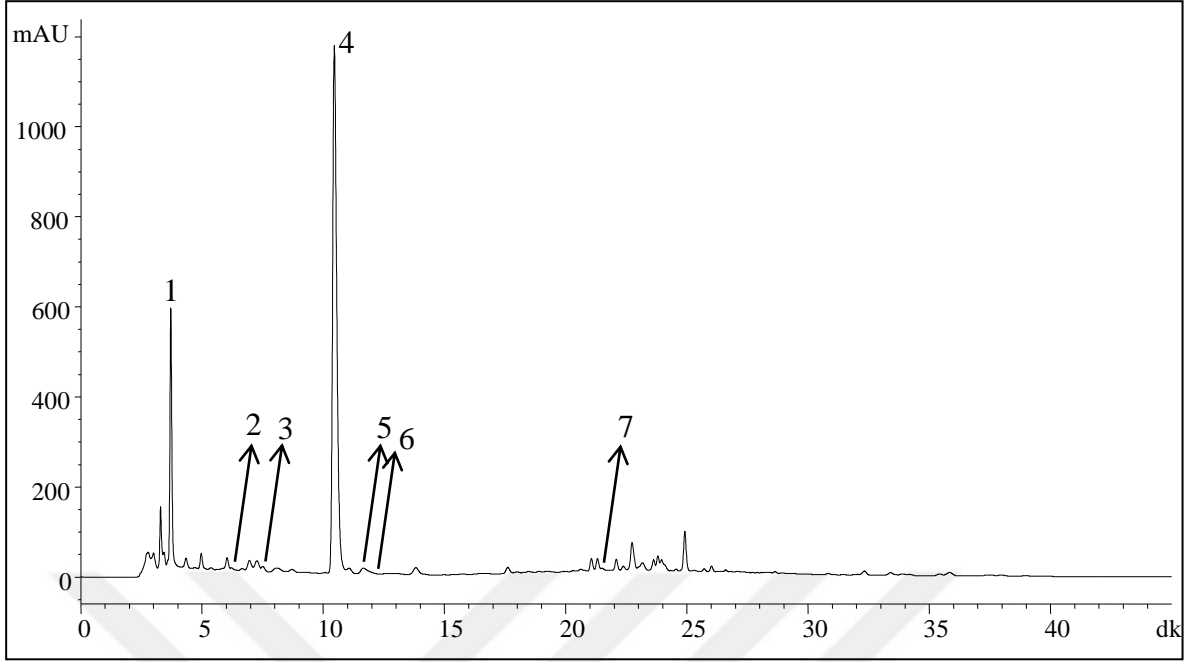
Şekil 74. 2. Nevi Siyah Çay (NÇS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı

Tablo 35. 2. Nevi Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	NÇS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	3.628	
2	Epigallokateşin	6.207	
3	Kateşin	7.481	
4	Kafein	10.411	

Tablo 35'in devamı

5	Epigallokateşin gallat	11.818	
6	Epikateşin	12.781	
7	Epikateşin gallat	21.379	



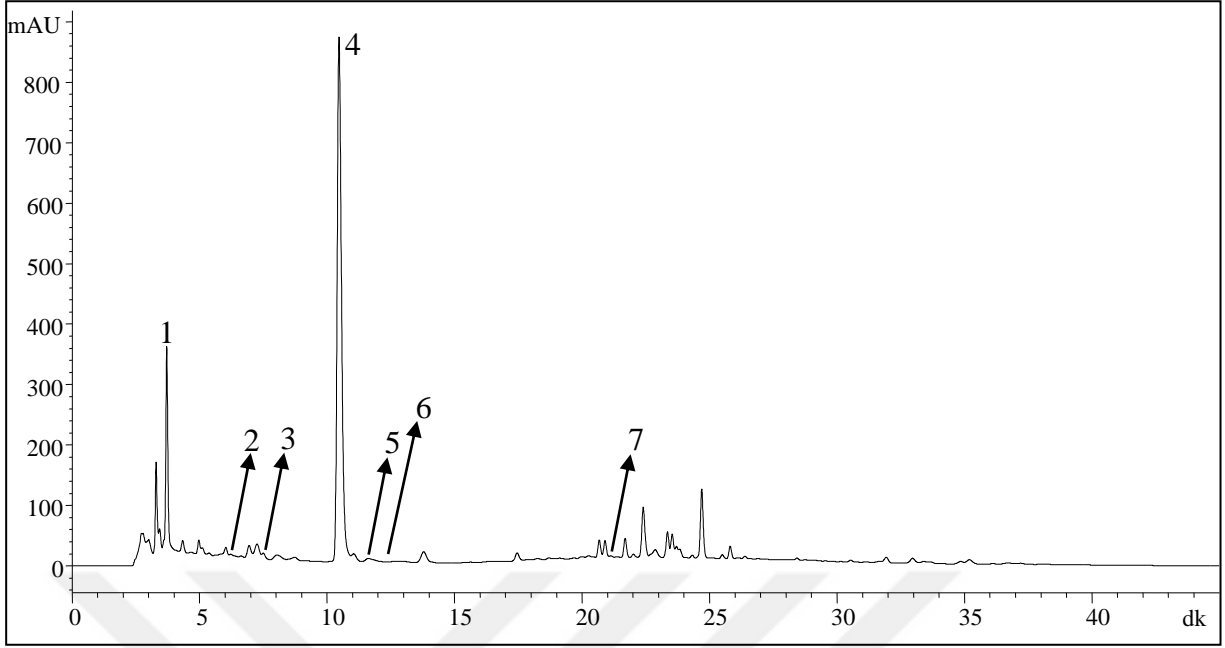
Şekil 75. Altınbaş Klasik Siyah Çay (ALS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı

Tablo 36. Altınbaş Klasik Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	ALS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	3.608	<p>The DAD spectrum for Gallic acid shows a broad absorption peak centered at approximately 270 nm, with a maximum absorbance of about 600 mAU. There is a smaller peak at approximately 230 nm.</p>
2	Epigallokateşin	6.026	<p>The DAD spectrum for Epigallocatechin shows a sharp absorption peak at approximately 230 nm, with a maximum absorbance of about 20 mAU. The absorbance is significantly lower than that of Gallic acid.</p>

Tablo 36'nın devamı

3	Kateşin	7.246	
4	Kafein	10.120	
5	Epigallokateşin gallat	11.286	
6	Epikateşin	12.113	
7	Epikateşin gallat	21.461	



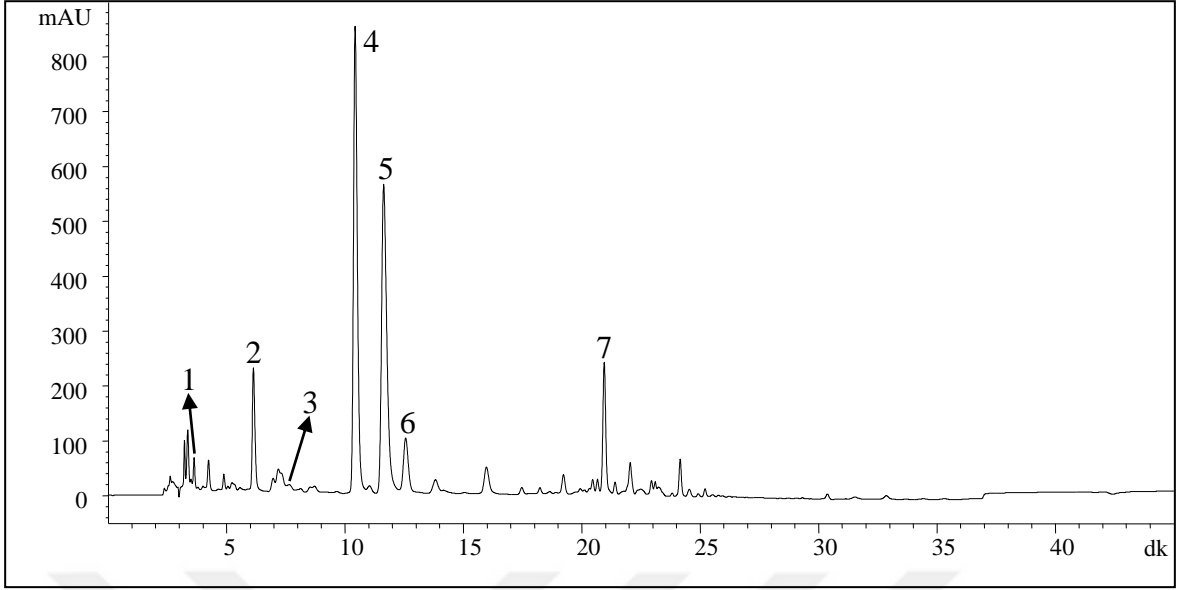
Şekil 76. Organik Hemşin Siyah Çay (OHS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı

Tablo 37. Organik Hemşin Siyah Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	OHS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	3.619	
2	Epigallokateşin	6.137	

Tablo 37'nin devamı

3	Kateşin	7.406	
4	Kafein	10.373	
5	Epigallokateşin gallat	11.474	
6	Epikateşin	12.468	
7	Epikateşin gallat	21.033	



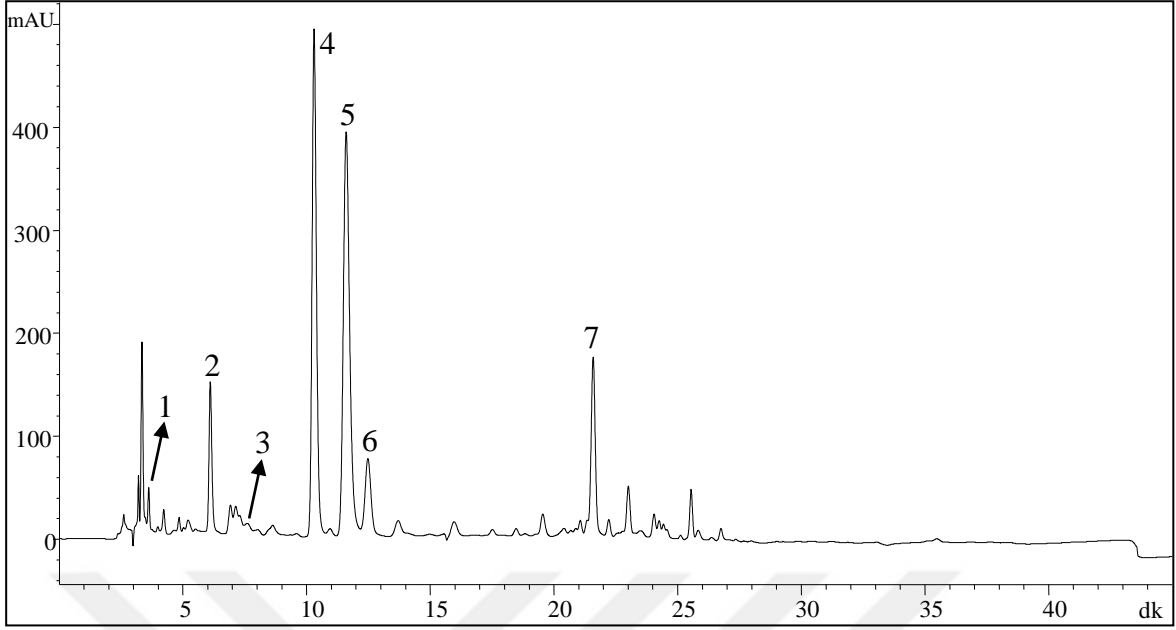
Şekil 77. Antik Yeşil Çay (AYS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı

Tablo 38. Antik Yeşil Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	AYS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	3.610	
2	Epigallokateşin	6.098	

Tablo 38'in devamı

3	Kateşin	7.343	
4	Kafein	10.383	
5	Epigallokateşin gallat	11.556	
6	Epikateşin	12.483	
7	Epikateşin gallat	20.883	



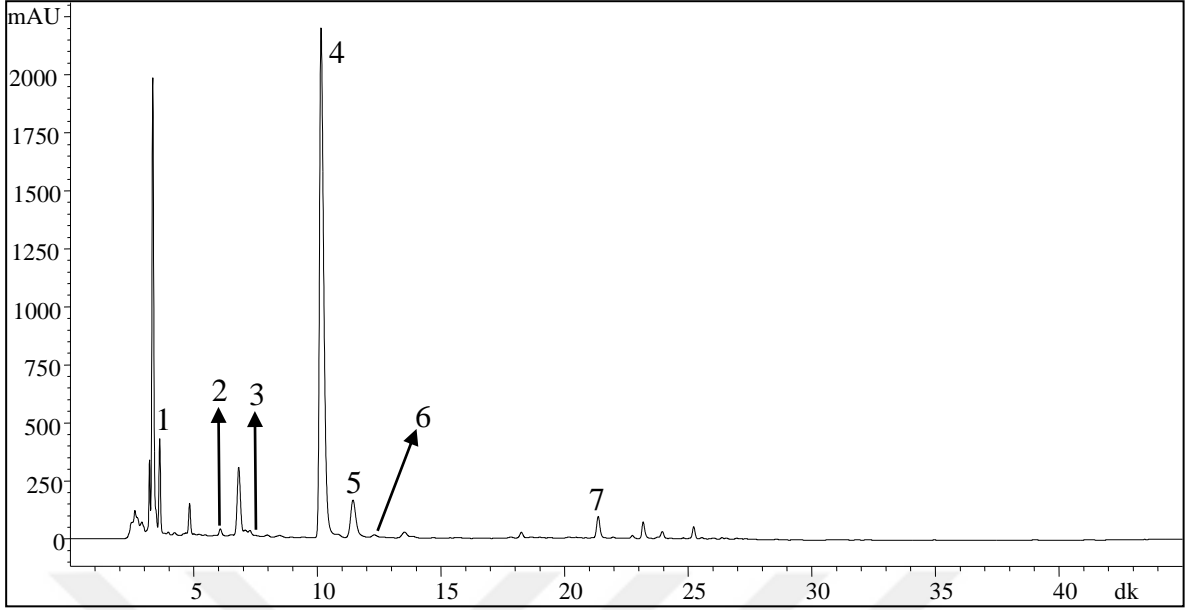
Şekil 78. Organik Zümrüt Yeşil Çay (OYS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı

Tablo 39. Organik Zümrüt Yeşil Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	OYS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	3.616	
2	Epigallocateşin	6.109	

Tablo 39'un devamı

3	Kateşin	7.329	
4	Kafein	10.302	
5	Epigallokateşin gallat	11.596	
6	Epikateşin	12.482	
7	Epikateşin gallat	21.576	

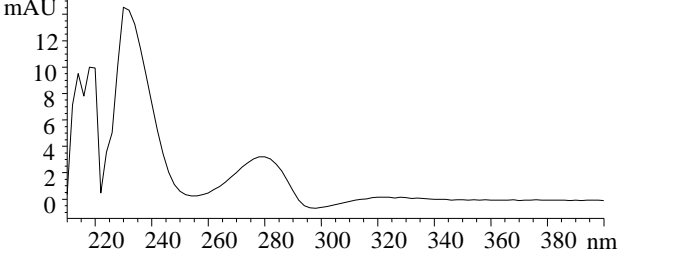
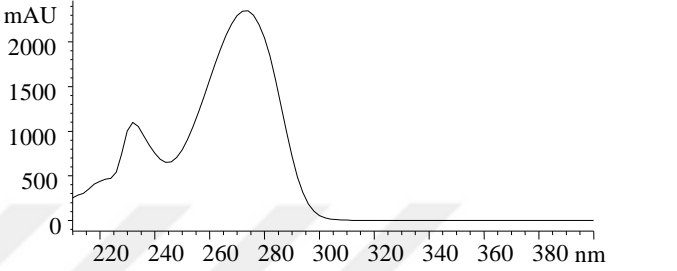
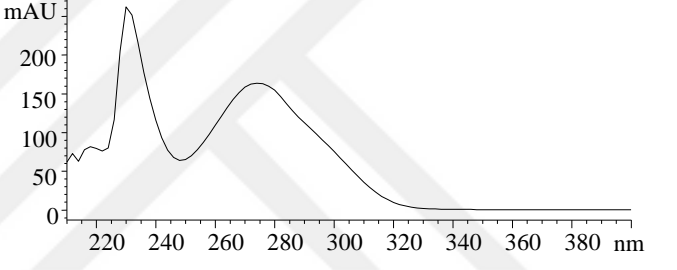
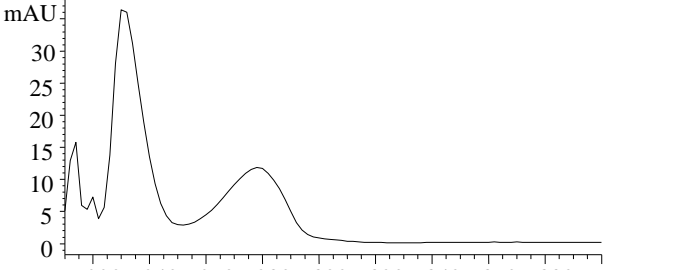
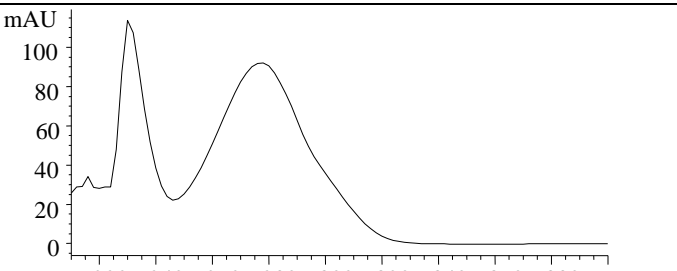


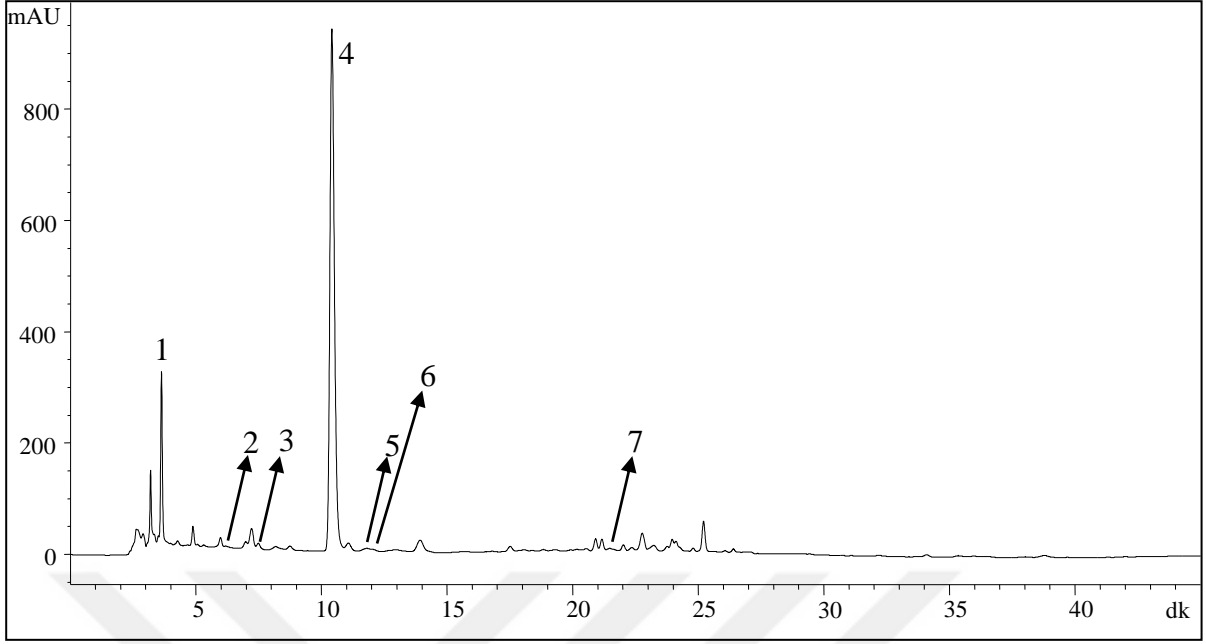
Şekil 79. Beyaz Çay (BÇS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı

Tablo 40. Beyaz Çay ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	BÇS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	3.615	<p>The DAD spectrum for Gallic acid shows a broad absorption peak centered at approximately 270 nm, with a maximum absorbance of about 400 mAU. There is a smaller peak at approximately 230 nm.</p>
2	Epigallokateşin	6.074	<p>The DAD spectrum for Epigallocatechin shows a sharp peak at approximately 230 nm (absorbance ~100 mAU) and a broader peak at approximately 270 nm (absorbance ~40 mAU).</p>

Tablo 40'in devamı

3	Kateşin	7.528	
4	Kafein	10.148	
5	Epigallokateşin gallat	11.441	
6	Epikateşin	12.315	
7	Epikateşin gallat	21.348	



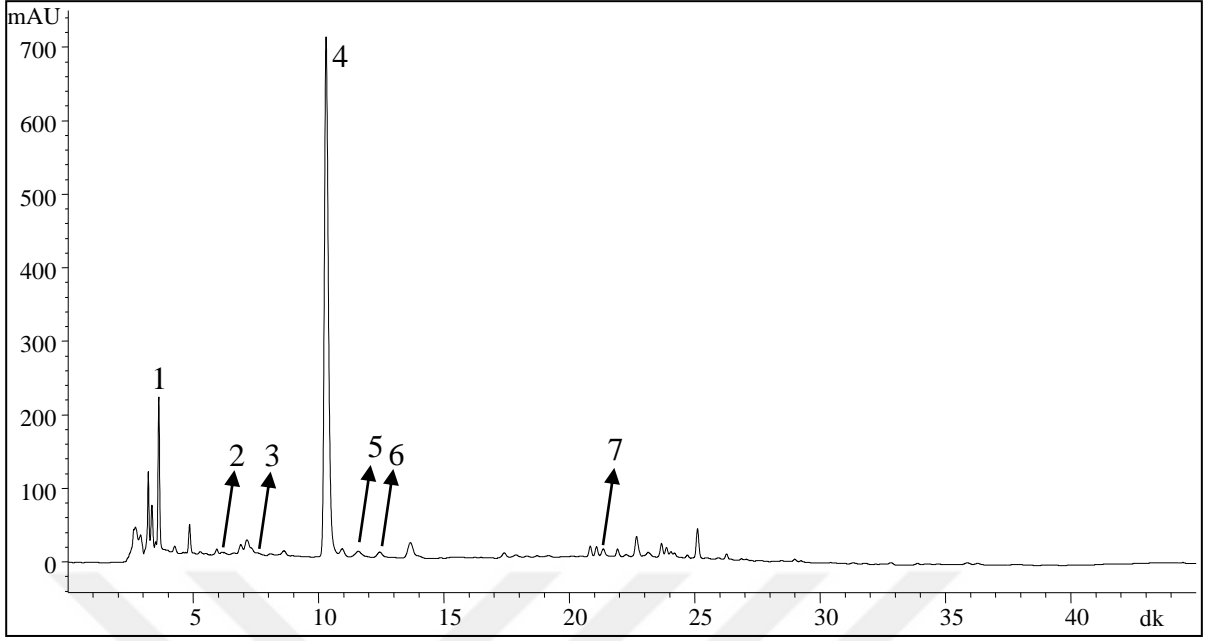
Şekil 80. Çay Lifi (ÇLS) ekstraktının DAD-278 nm'deki kromatogramı

Tablo 41. Çay Lifi ekstraktındaki bileşikler, RT' leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	ÇLS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	3.630	<p>The DAD spectrum for Gallik asit shows a broad absorption peak centered at approximately 270 nm, with a maximum absorbance of about 300 mAU. There is a smaller peak at approximately 230 nm.</p>
2	Epigallokateşin	6.190	<p>The DAD spectrum for Epigallokateşin shows a sharp absorption peak at approximately 230 nm, with a maximum absorbance of about 10 mAU. There are several smaller peaks at lower wavelengths (around 210-220 nm).</p>

Tablo 41'in devamı

3	Kateşin	7.488	
4	Kafein	10.408	
5	Epigallokateşin gallat	11.800	
6	Epikateşin	12.375	
7	Epikateşin gallat	21.481	



Şekil 81. Çay Çöpü (ÇÇS) ekstraktının DAD-278 nm’deki kromatogramı

Tablo 42. Çay Çöpü ekstraktındaki bileşikler, RT’ leri ve bileşiklerin DAD spektrumları

No	Bileşik Adı	RT (dk)	ÇÇS ekstraktındaki bileşiklerin DAD spektrumu
1	Gallik asit	3.621	<p>The DAD spectrum of Gallic acid shows absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 200) and wavelength (nm) on the x-axis (220 to 380). The spectrum features a broad absorption band with a maximum absorbance of approximately 200 mAU at 270 nm.</p>
2	Epigallokateşin	6.141	<p>The DAD spectrum of Epigallocatechin shows absorbance (mAU) on the y-axis (-4 to 12) and wavelength (nm) on the x-axis (220 to 380). The spectrum exhibits a sharp peak at 220 nm (approx. 12 mAU) and a broader peak at 270 nm (approx. 5 mAU).</p>

Tablo 42'nin devamı

3	Kateşin	7.342	
4	Kafein	10.295	
5	Epigallokateşin gallat	11.661	
6	Epikateşin	12.435	
7	Epikateşin gallat	21.142	

Tablo 43. HPLC-DAD ile siyah çay, beyaz çay, yeşil çay, çay lifi ve çay çözümlerindeki kateşinler, kafein ve gallik asit miktarları

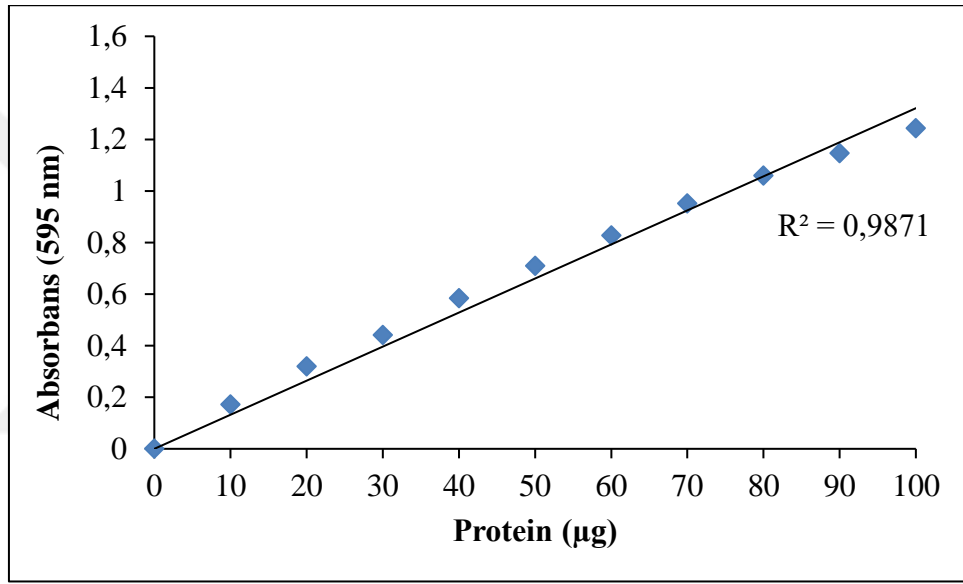
Numune	Gallik asit	EGC	Kateşin	Kafein	EGCG	EC	ECG
Ekstrakttaki kateşin miktarları (ppm, mg/L ekstrakt)							
Antik Yeşil Çay (AYS)	31,9	3033,7	163,6	1061,0	2015,6	811,5	373,2
Organik Zümrüt Yeşil Çay (OYS)	21,7	1953,8	91,7	595,6	1424,8	612,6	319,6
Beyaz Çay (BÇS)	127,2	582,4	88,8	2179,2	478,5	191,3	141,4
2. Nevi Siyah Çay (NÇS)	175,0	413,2	128,4	1242,1	121,7	96,3	58,8
Altınbaş Klasik Siyah Çay (ALS)	229,2	297,5	158,4	1344,9	221,7	171,5	42,3
Organik Hemşin Siyah Çay (OHS)	151,2	435,2	120,5	961,8	108,7	95,3	36,1
Çay Çözümleri (ÇÇS)	74,6	114,9	142,7	697,2	82,7	180,9	56,3
Çay Lifli (ÇLS)	102,4	181,0	102,8	923,4	73,4	43,5	41,7
Kuru ekstrakttaki kateşin miktarları (ppm, mg/kg ekstrakt)							
Antik Yeşil Çay (AYS)	1123,5	106696,4	5752,9	37315,1	70889,7	28542,1	13124,0
Organik Zümrüt Yeşil Çay (OYS)	852,3	76586,4	3595,3	23345,1	55851,9	24011,3	12528,1
Beyaz Çay (BÇS)	5816,8	26627,1	4059,7	99635,9	21877,1	8747,3	6466,9
2. Nevi Siyah Çay (NÇS)	7435,3	17559,3	5455,8	52789,9	5171,5	4090,9	2497,1
Altınbaş Klasik Siyah Çay (ALS)	8869,3	11511,4	6130,3	52037,2	8577,1	6634,5	1638,5
Organik Hemşin Siyah Çay (OHS)	5926,5	17052,8	4722,5	37686,8	4259,6	3736,3	1414,7
Çay Çözümleri (ÇÇS)	3409,0	5251,2	6519,9	31849,8	3779,8	8266,1	2572,8
Çay Lifli (ÇLS)	5100,9	9015,0	5119,8	45995,3	3654,2	2167,0	2075,4
Kuru çaydaki kateşin miktarları (ppm, mg/kg çay)							
Antik Yeşil Çay (AYS)	319,5	30337,3	1635,7	10609,9	20156,3	8115,5	3731,6
Organik Zümrüt Yeşil Çay (OYS)	217,4	19538,1	917,2	5955,6	14248,4	6125,5	3196,1
Beyaz Çay (BÇS)	1272,2	5823,7	887,9	21791,8	4784,8	1913,2	1414,4
2. Nevi Siyah Çay (NÇS)	1749,5	4131,7	1283,8	12421,5	1216,9	962,6	587,6
Altınbaş Klasik Siyah Çay (ALS)	2292,3	2975,1	1584,4	13449,0	2216,7	1714,7	423,5
Organik Hemşin Siyah Çay (OHS)	1512,5	4351,9	1205,2	9617,7	1087,0	953,5	361,0
Çay Çözümleri (ÇÇS)	746,2	1149,4	1427,1	6971,6	827,4	1809,3	563,2
Çay Lifli (ÇLS)	1024,1	1809,9	1027,9	9234,4	733,6	435,1	416,7

(EGC: epigallocateşin, EGCG: epigallocateşin gallat, EC: epikateşin, ECG: epikateşin gallat)

3.3. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

3.3.1. Bradford Yöntemi ile Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

Afinite kromatografisi ile elue edilen BCA, hCAI ve hCAII izoenzimlerinde, Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bunun için 100 µl enzim çözeltisi kullanıldı. Şekil 82’de çizilen standart grafik referans alınarak saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları hesaplanmıştır. Standart grafik denkleminde ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein miktarları hesaplanmıştır.

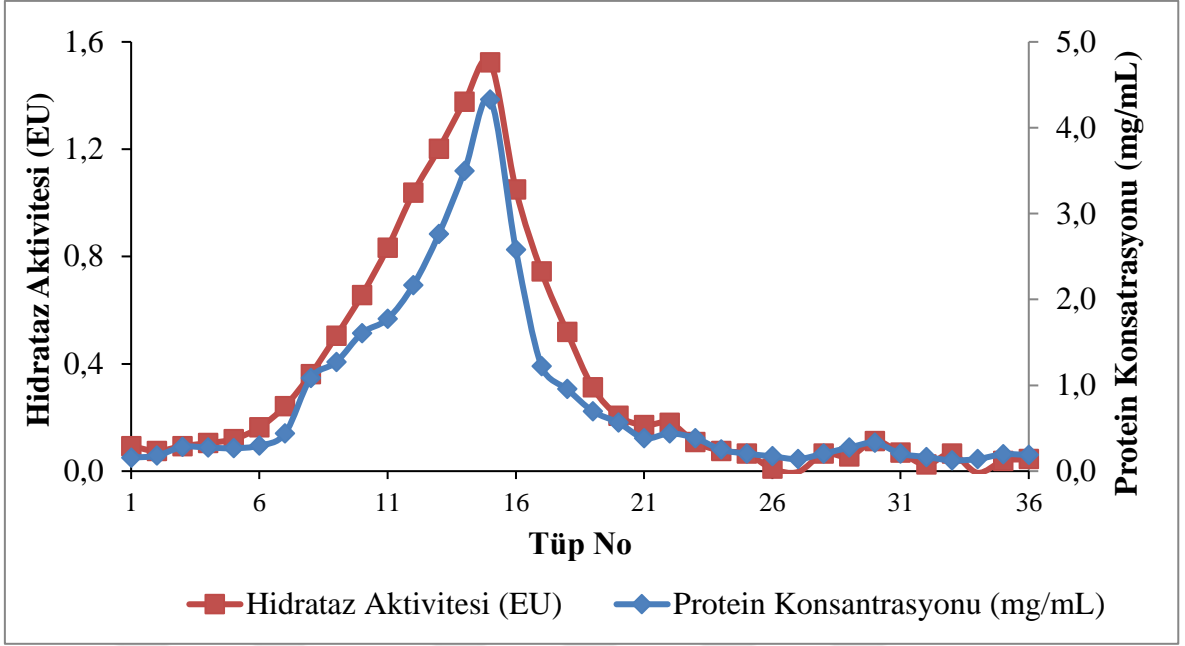


Şekil 82. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik

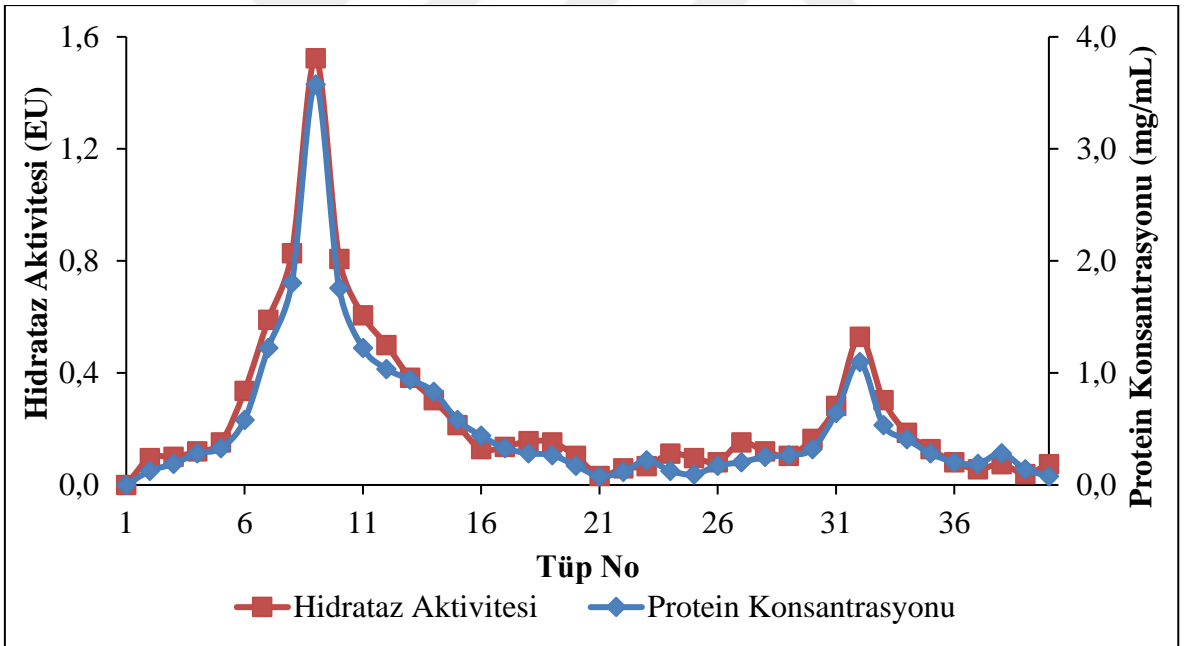
3.3.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Sığır eritrositlerinden BCA enzimi ve insan eritrositlerinden hCAI ve hCAII izoenzimleri ayrı ayrı saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi ile elde edilen 5 mL’lik fraksiyon tüplerinde Bradford yöntemiyle yapılan protein tayininden sonra, herbir fraksiyon tüpününün 280 nm’deki absorbanslarına bakılarak CA hidrataz aktivitesi ölçüldü.

Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birinin değerleri Şekil 83 ve 84’e grafiğe aktarıldı. Buna göre fraksiyonlardaki protein konsantrasyonuyla hidrataz aktiviteleri birbirleriyle örtüşmektedir.



Şekil 83. Saflaştırılan BCA enziminin CA hidrataz aktivitesi ve protein tayin grafiği

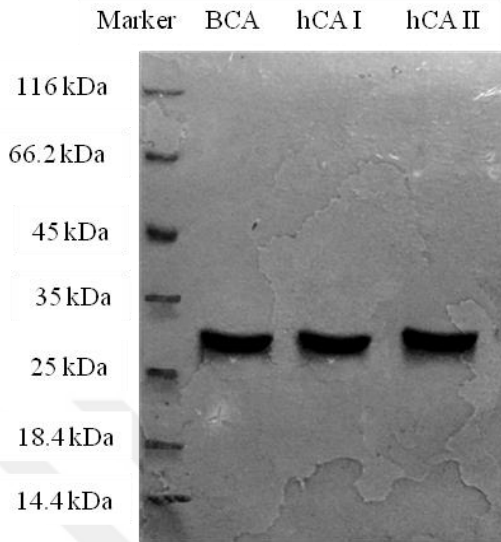


Şekil 84. Saflaştırılan hCAI ve hCAII izoenzimlerin CA hidrataz aktivitesi ve protein tayin grafiği

3.3.3. SDS-PAGE ile Karbonik Anhidrazın Saflığının Kontrolü

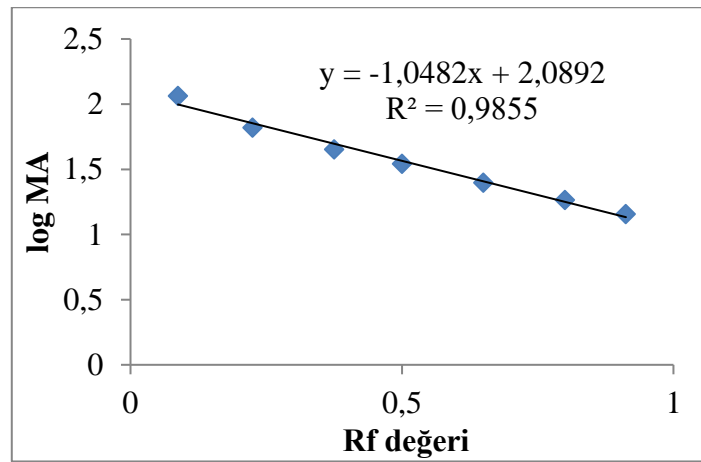
Afinite kromatografisi ile eritrositlerden saflaştırılan sıgır karbonik anhidraz (BCA) enzimi ve insan karbonik anhidraz (hCAI ve hCAII) izoenzimleri liyofilize edilerek

deriştirildi ve saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE (Bölüm 2.2.5.) uygulandı. Standart olarak molekül ağırlığı bilinen protein markeri kullanıldı. Belirginleşen protein bantlarının görüntüsü alındı (Şekil 85).



Şekil 85. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA) ve insan karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCAI ve hCAII) SDS-PAGE görüntüsü

Protein standartlarının relatif göç hızları (Rf değeri) ile molekül ağırlıklarının logaritması alınarak standart bir grafik çizildi. Bu grafiğin denklemi $y = -1.0482x + 2.0892$ tamamlayıcılık katsayısı $R^2 = 0.9855$ olarak bulundu (Şekil 86). BCA, hCAI ve hCAII enzimlerinin molekül ağırlığı yaklaşık 30 kDa' dur. Bu denklemden yararlanarak SDS-PAGE elektroforezinde saflaştırılan enzimin de yaklaşık molekül ağırlığı 30 kDa olarak hesaplandı.

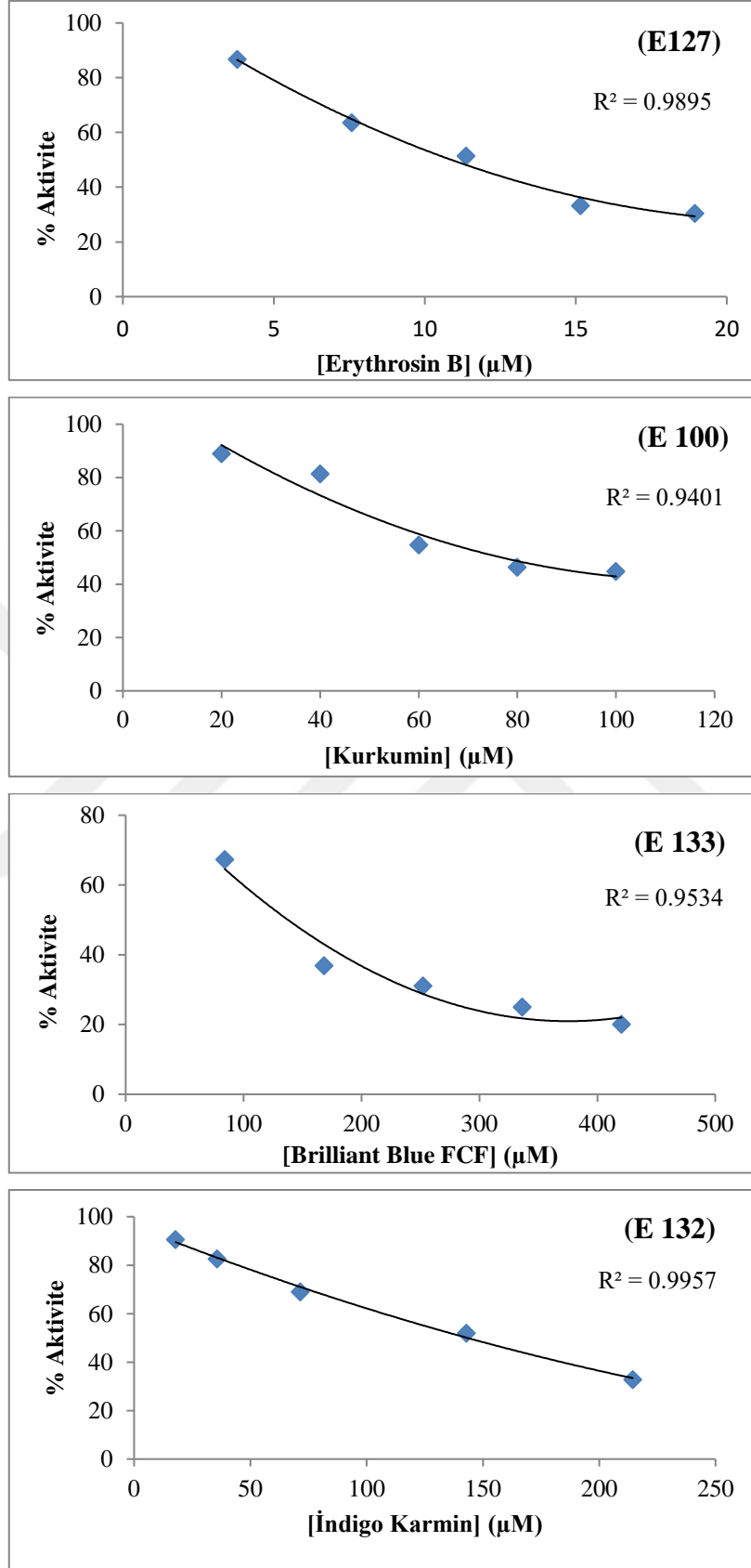


Şekil 86. Protein standartlarının Rf değeri ile molekül ağırlıklarının logaritması alınarak çizilen standart grafik

3.4. Gıda Katkı Maddelerinin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkileri

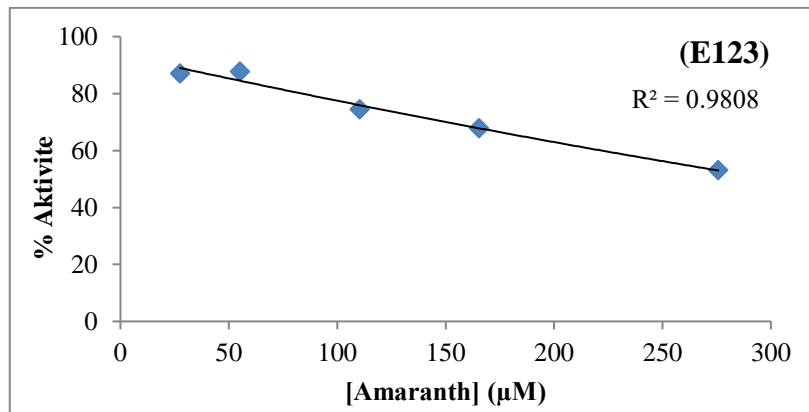
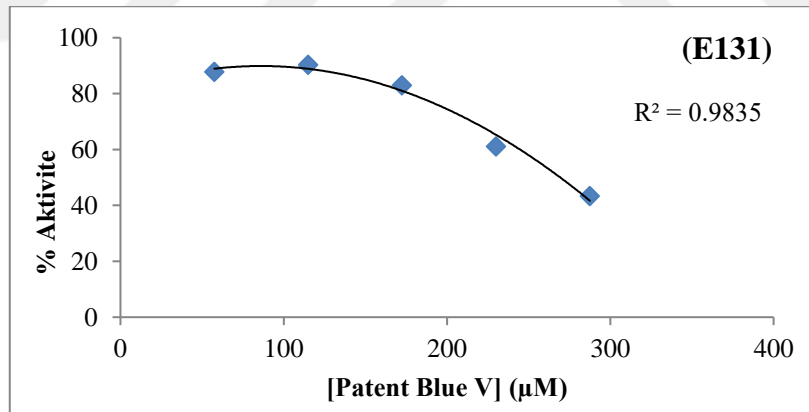
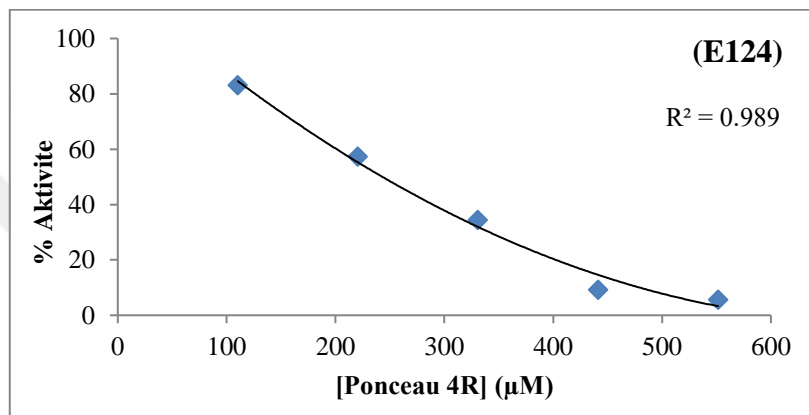
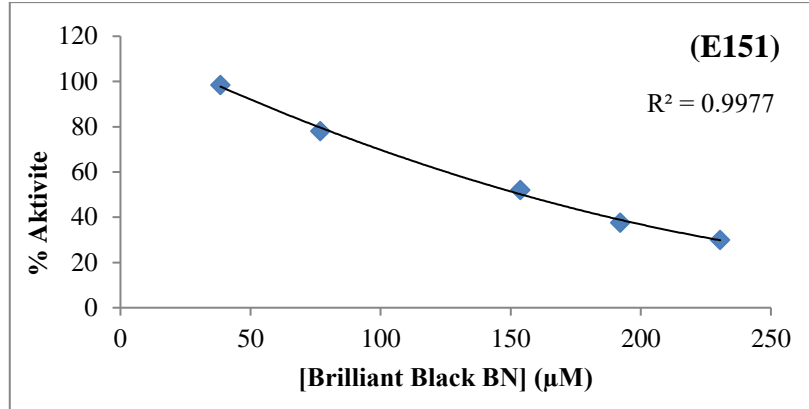
3.4.1. Gıda Katkı Maddelerinin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri

3 mM'lık doygun substrat konsantrasyonunda sığır karbonik anhidraz (BCA) enziminin esteraz aktivitesi üzerine 20 farklı gıda katkı maddesinin inhibisyon etkisi araştırıldı. Bunun için her bir gıda katkı maddesinin beş farklı konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisine sahip olan her bir gıda katkı maddesi için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi (Şekil 87). Çizilen grafiklerden % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) (Şekil 88) ve % inhibisyon (Şekil 89) değerleri hesaplandı. % İnhibisyon değerleri gıda katkı maddelerinin 2 mg/ml (son konsantrasyon 0.067 mg/mL)'de göstermiş oldukları inhibisyon değerleri kullanılarak verilmiştir.

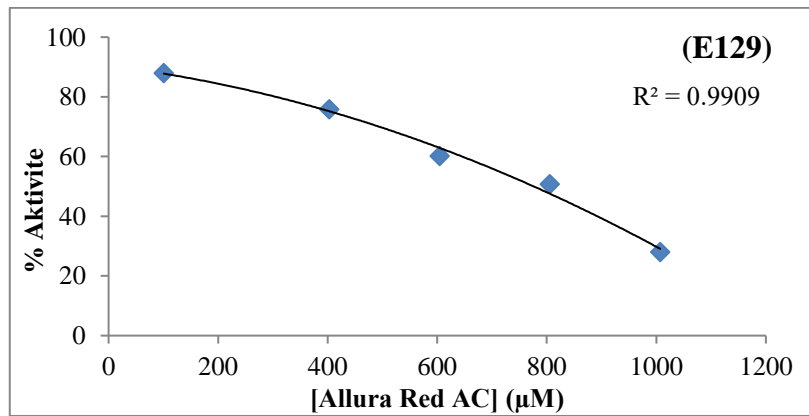
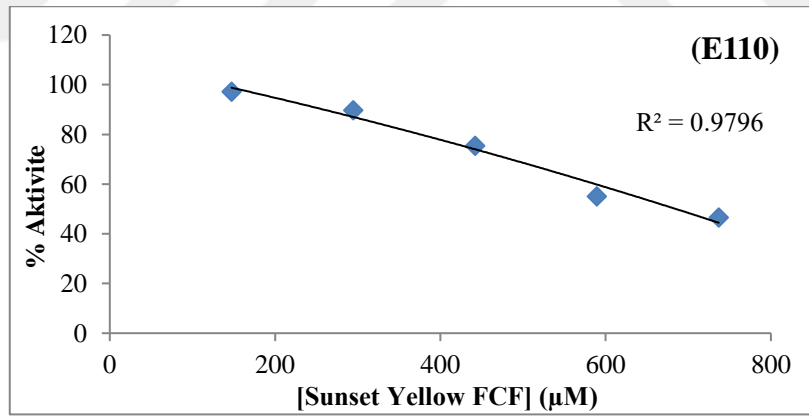
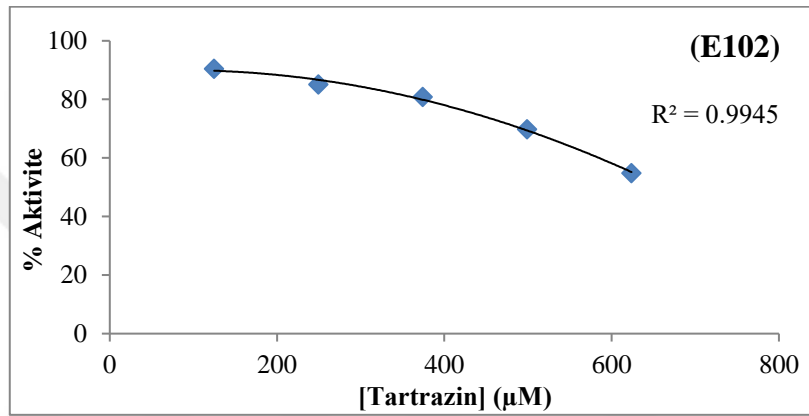
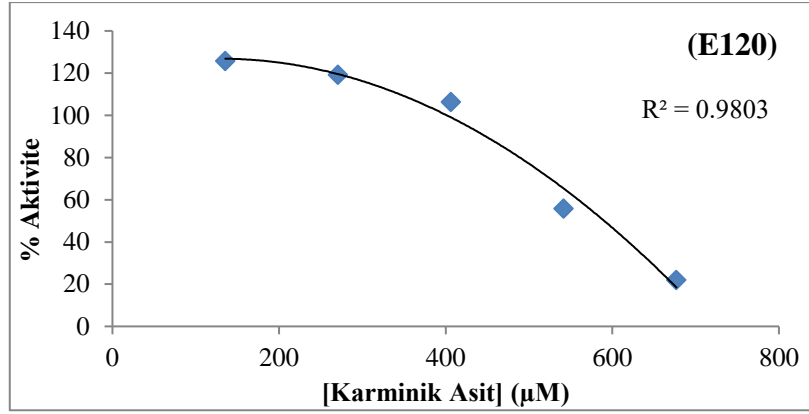


Şekil 87. BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çalışılan 20 farklı gıda katkı maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

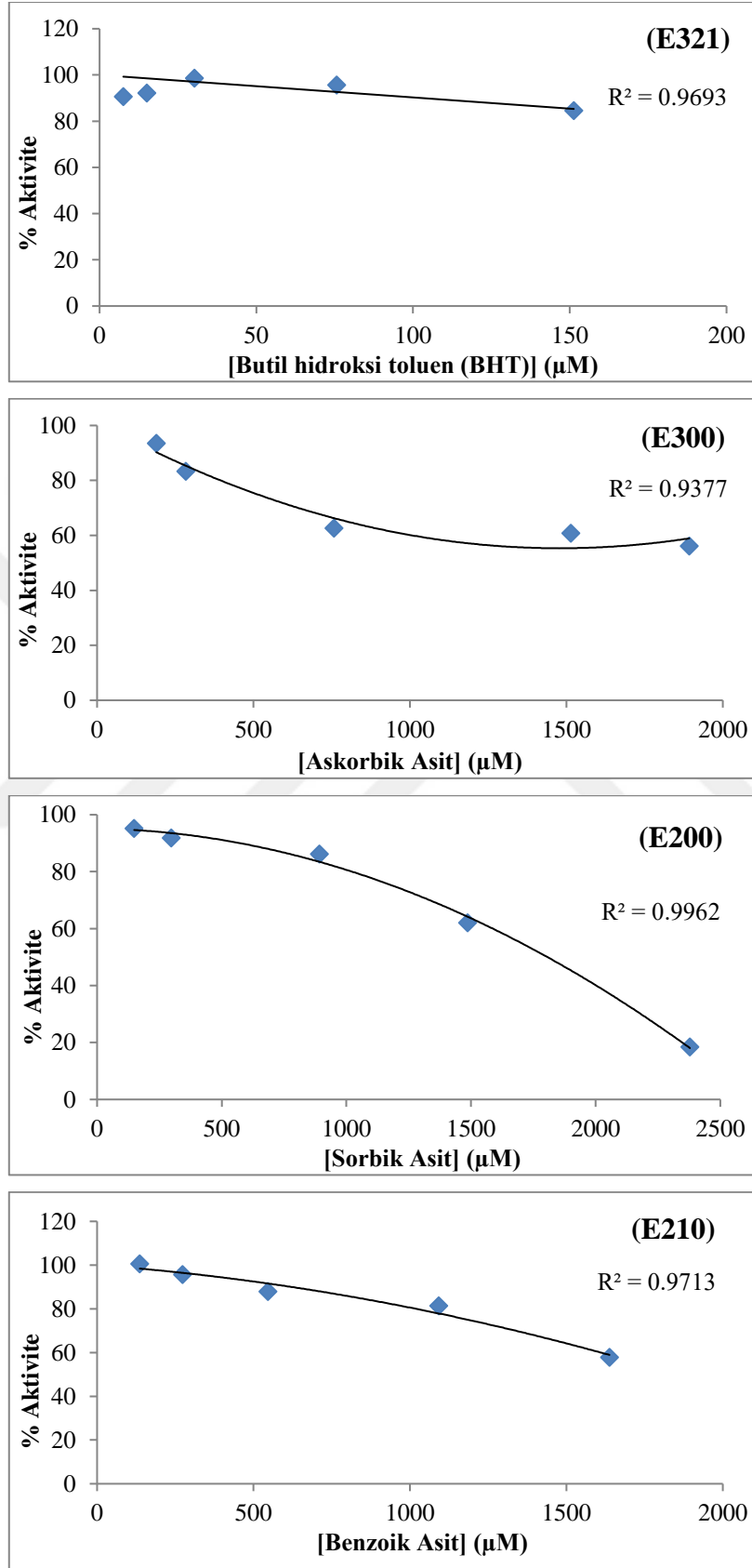
Şekil 87'nin devamı



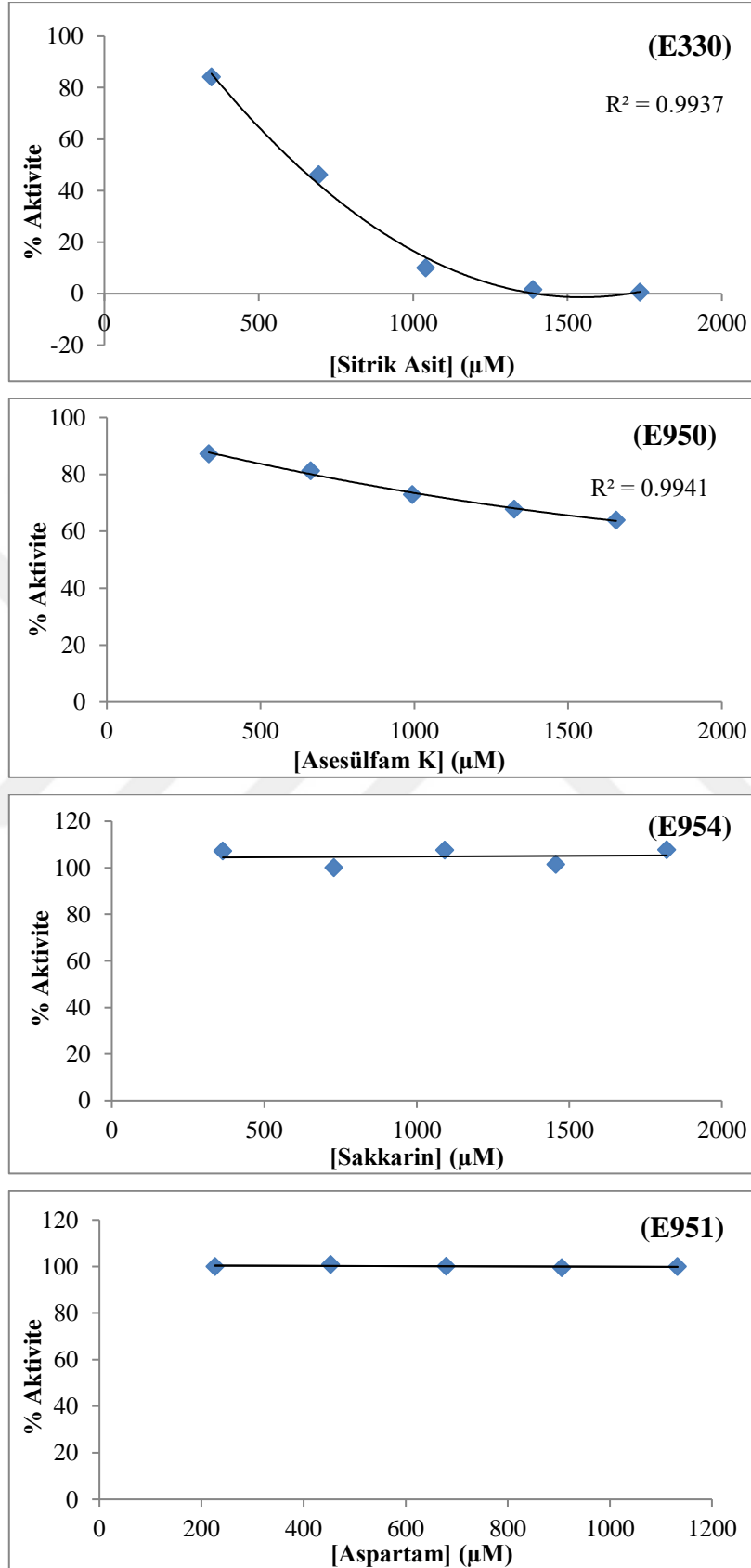
Şekil 87'nin devamı

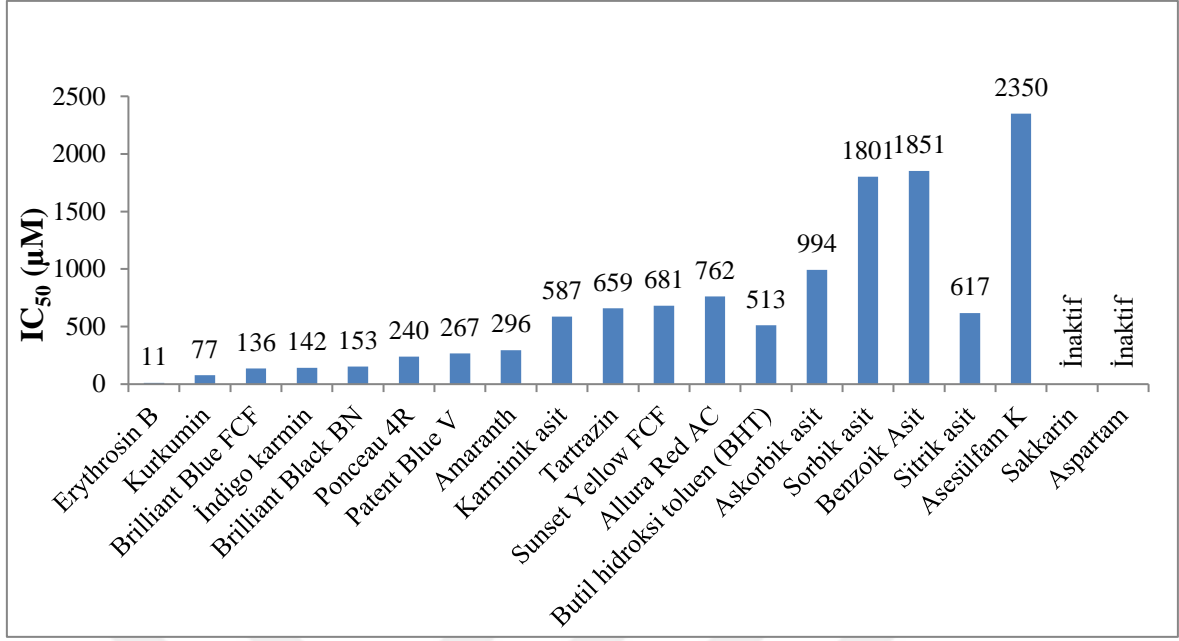


Şekil 87'nin devamı

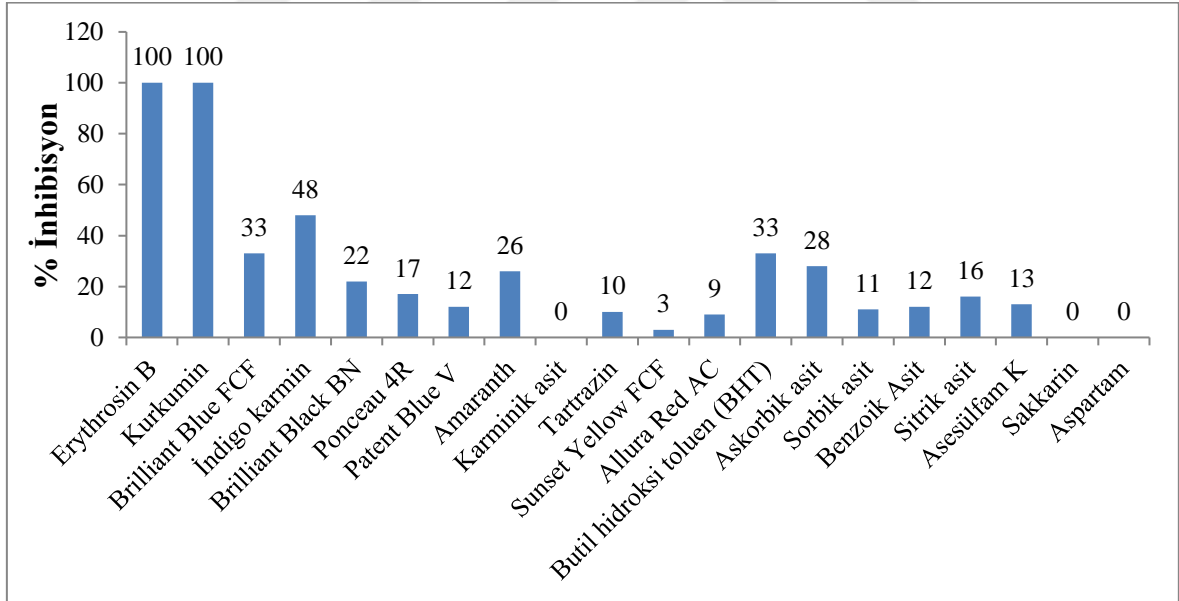


Şekil 87'nin devamı





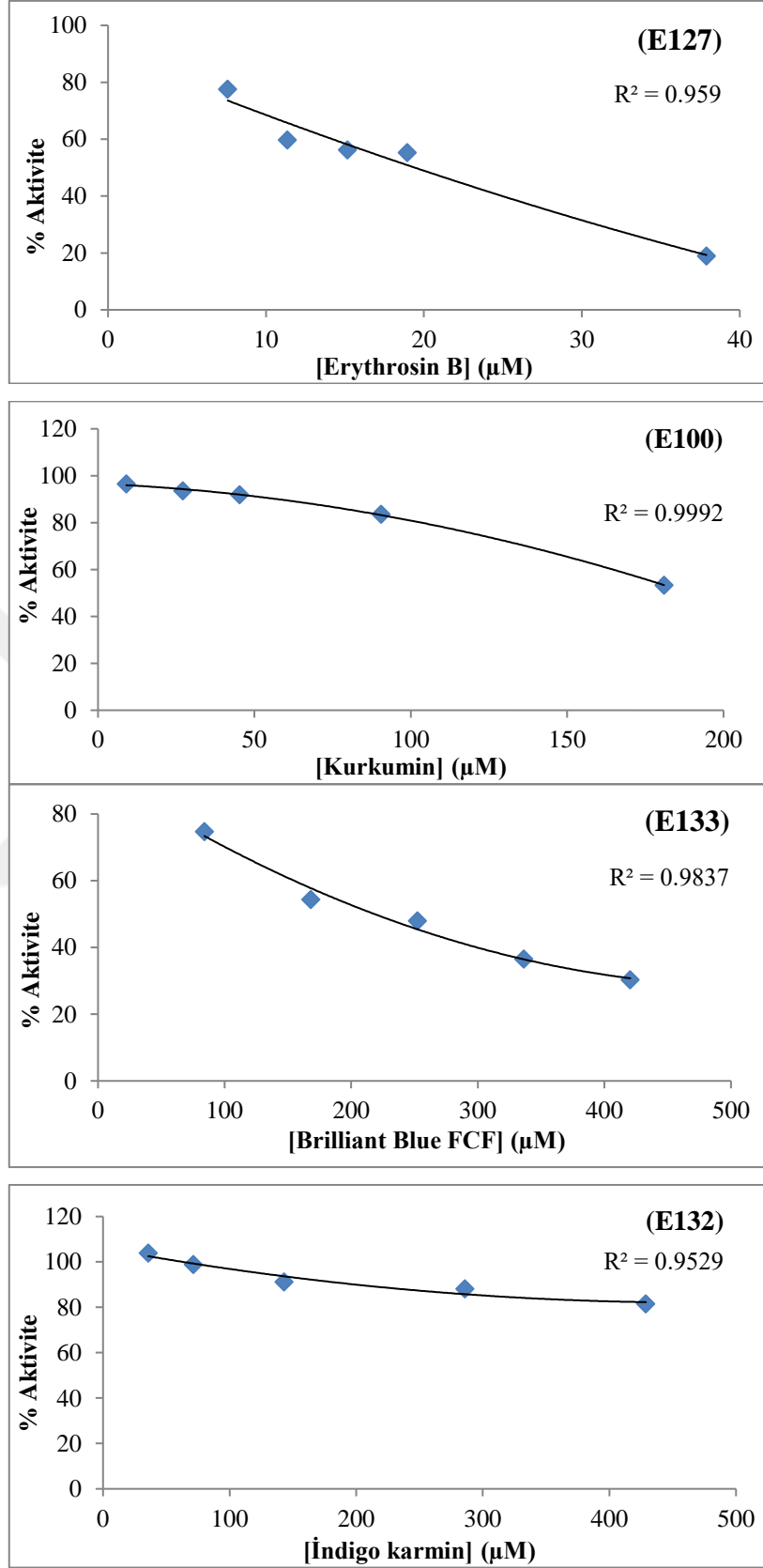
Şekil 88. BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin IC₅₀ (µM) değerleri



Şekil 89. BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin 2 mg/ml (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri

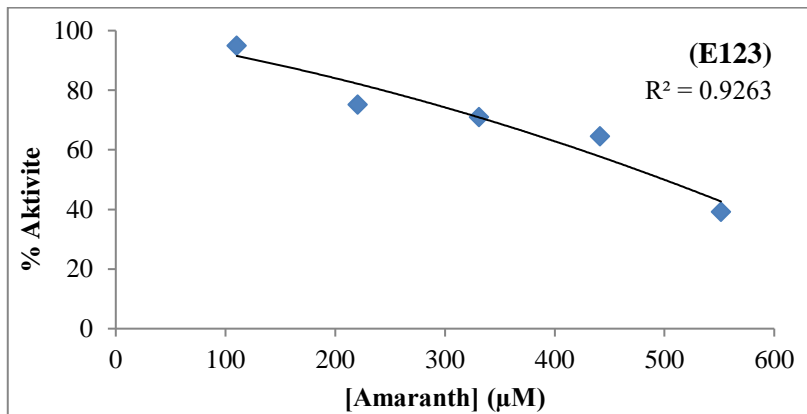
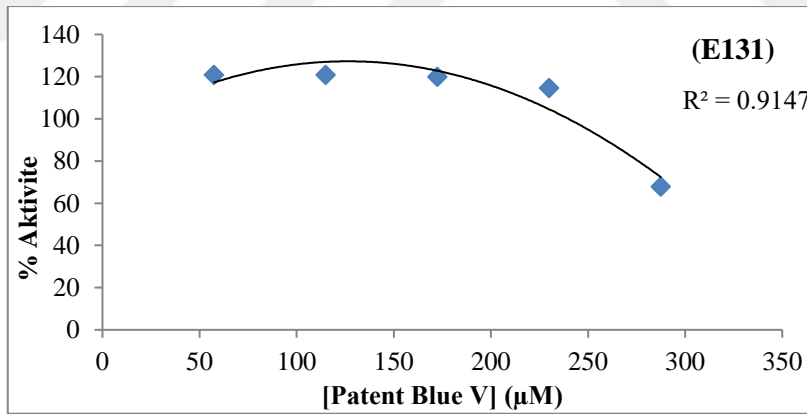
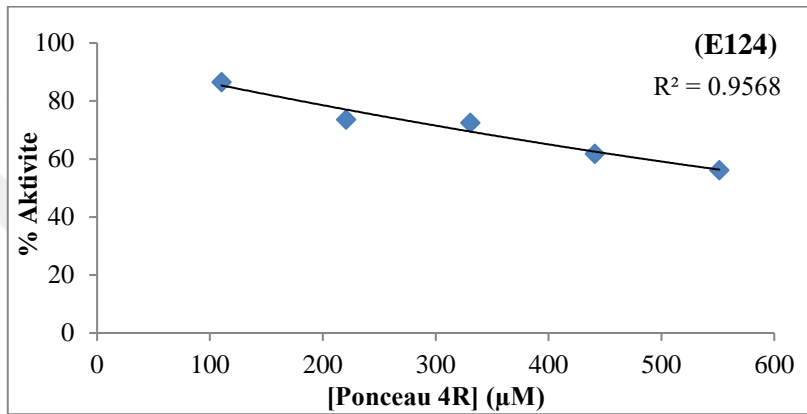
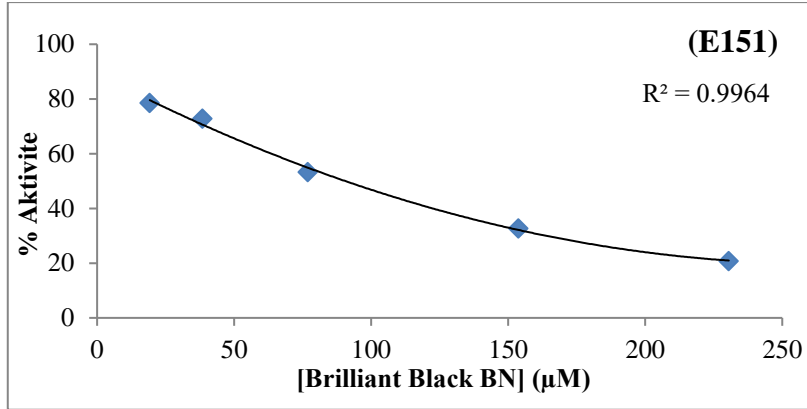
3.4.2. Gıda Katkı Maddelerinin hCAI ve hCAII İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri

3 mM'lık doymuş substrat konsantrasyonunda saflaştırılan hCAI ve hCAII izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerine 20 farklı gıda katkı maddesinin inhibisyon etkisi araştırıldı. Bunun için her bir gıda katkı maddesinin beş farklı konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon etkisine sahip olan her bir gıda katkı maddesi için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi (Şekil 90). Çizilen grafiklerden % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) (Şekil 91) ve % inhibisyon (Şekil 92) değerleri hesaplandı. % İnhibisyon değerleri gıda katkı maddelerinin 2 mg/mL (son konsantrasyon 0.067 mg/mL)'de göstermiş oldukları inhibisyon değerleri kullanılarak verilmiştir.

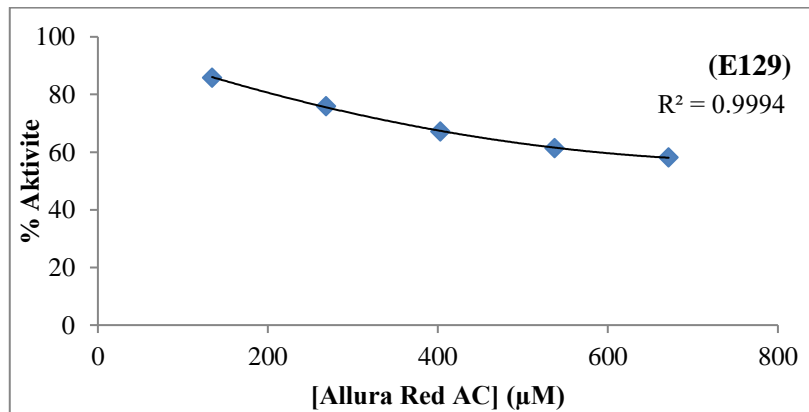
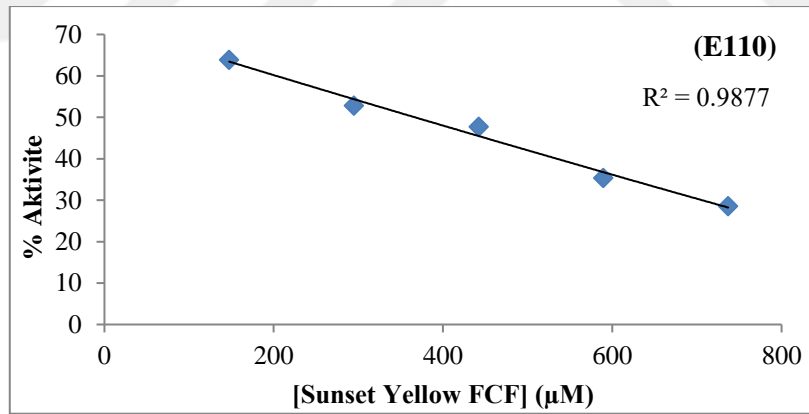
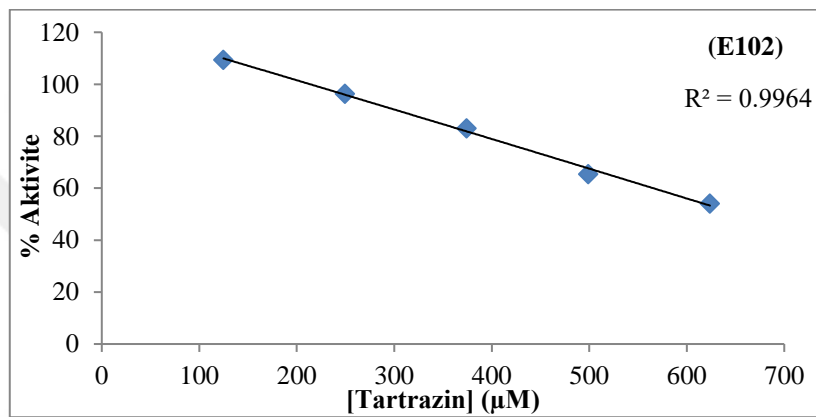
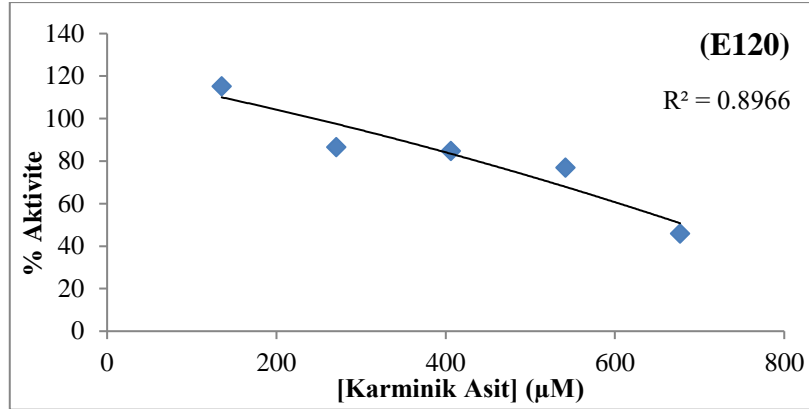


Şekil 90. hCAI enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan 20 farklı gıda katkı maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

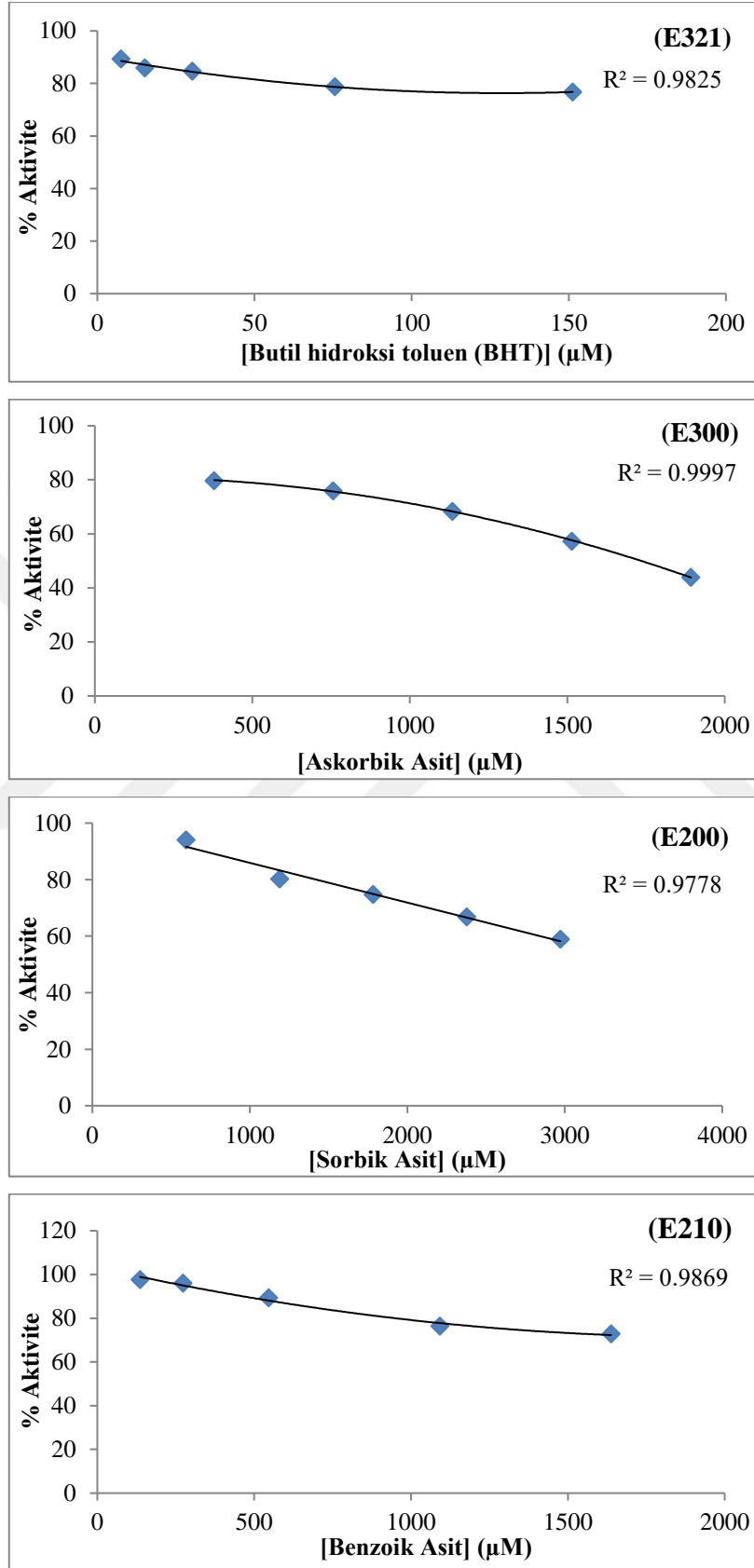
Şekil 90'nın devamı



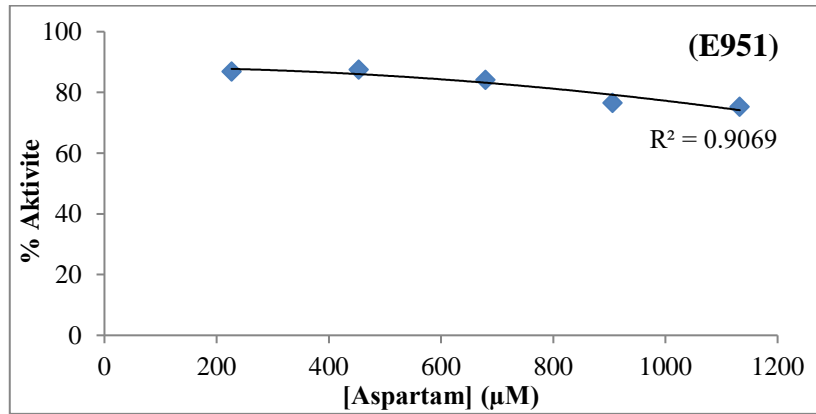
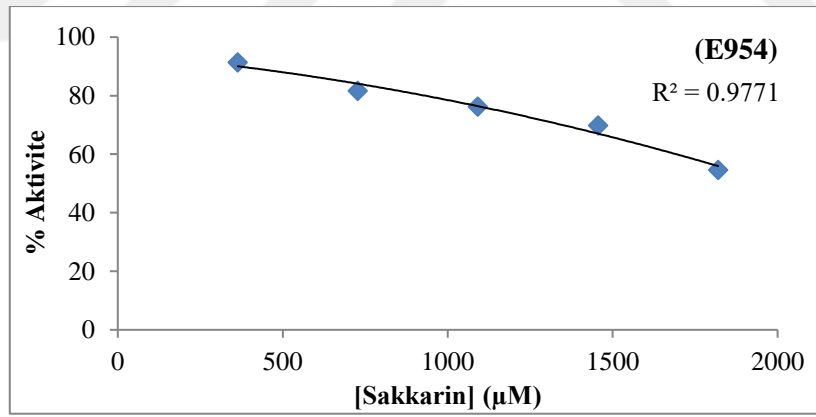
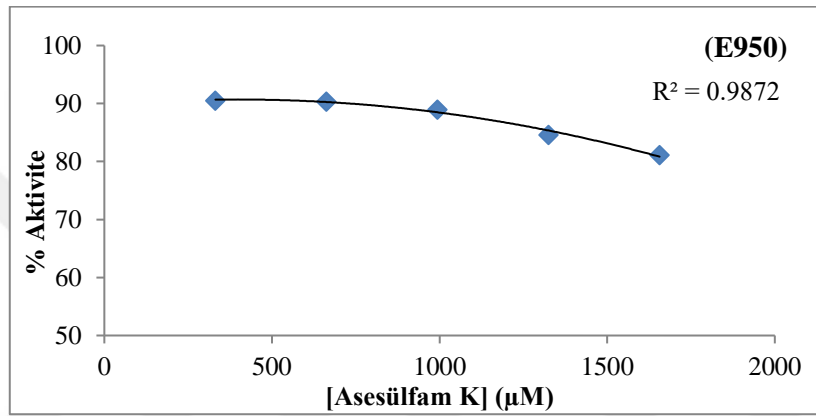
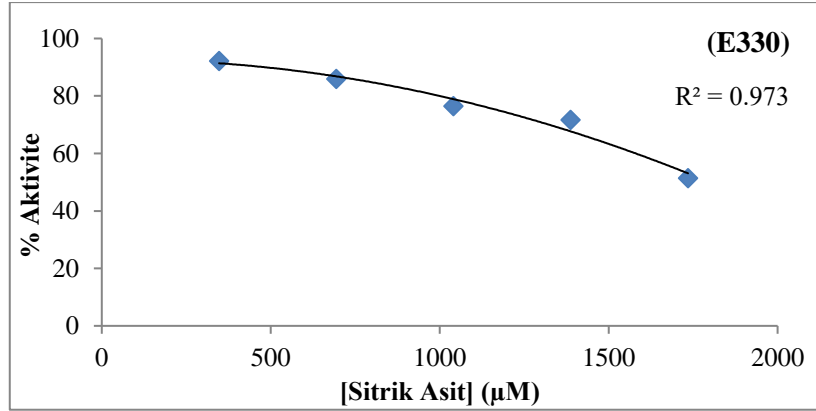
Şekil 90'nın devamı

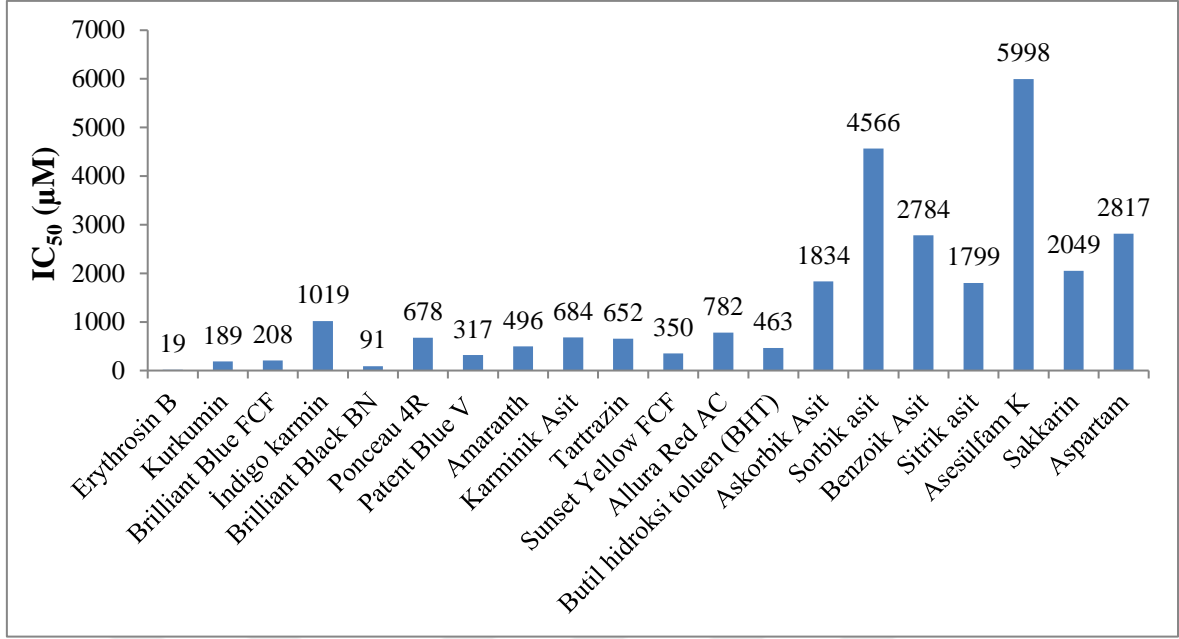


Şekil 90'nın devamı

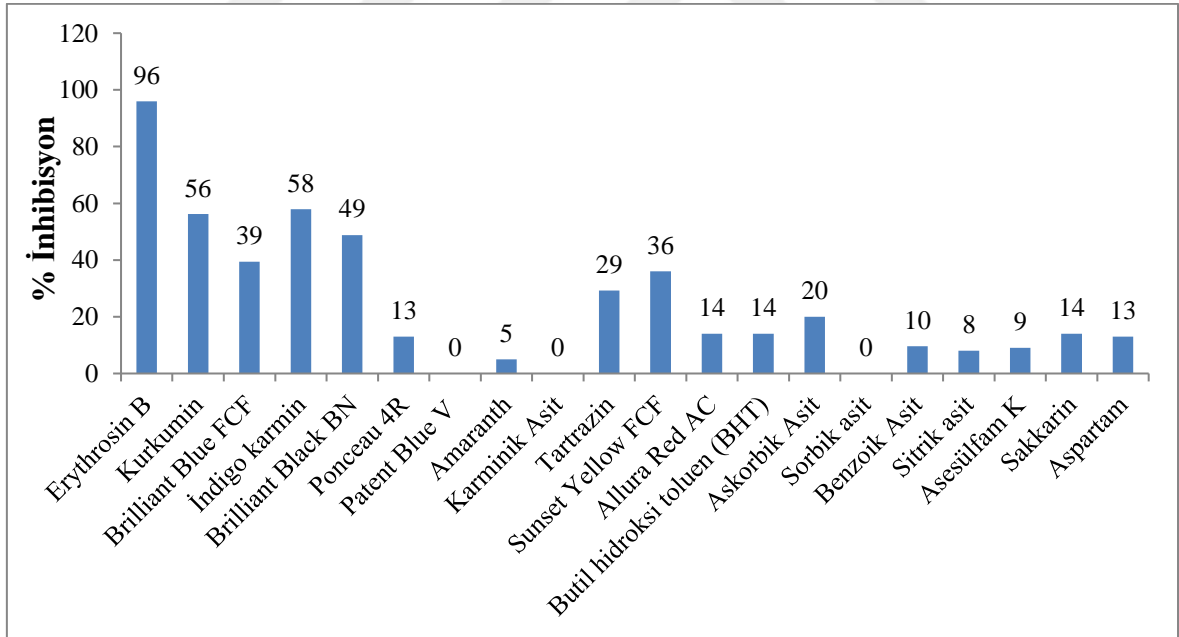


Şekil 90'nın devamı





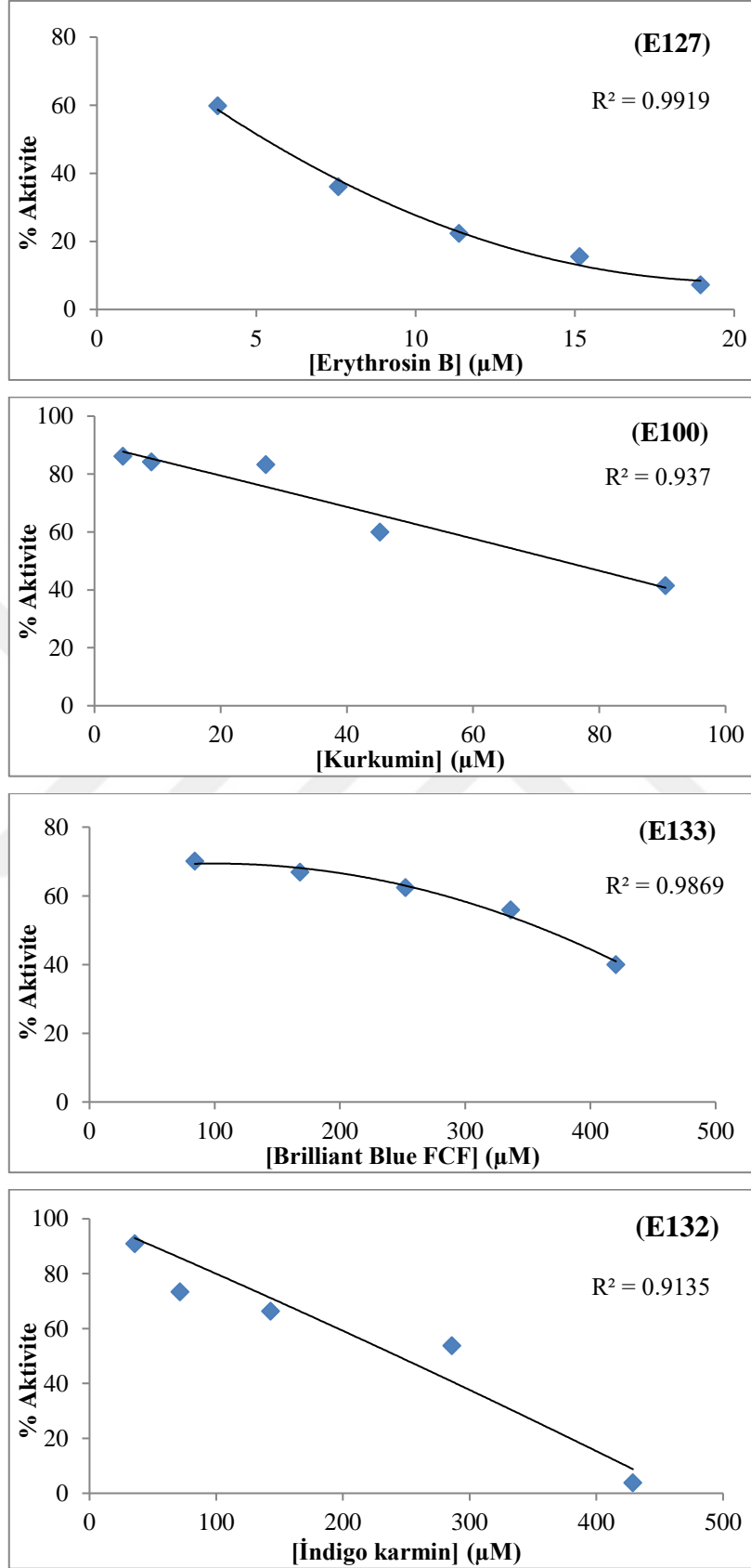
Şekil 91. hCAI esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin IC₅₀ (µM) değerleri



Şekil 92. hCAI esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri

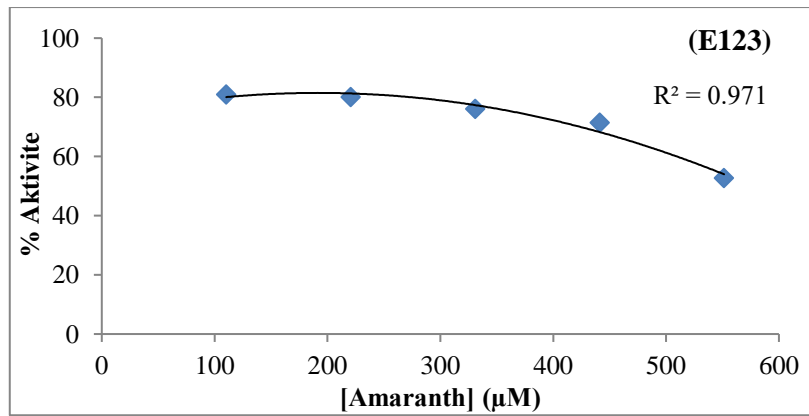
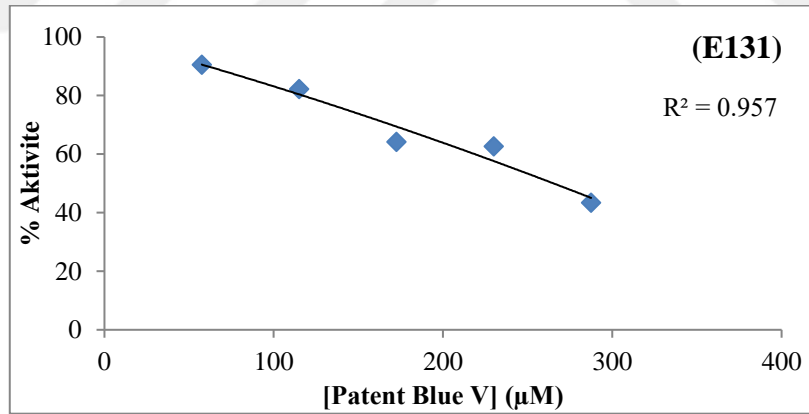
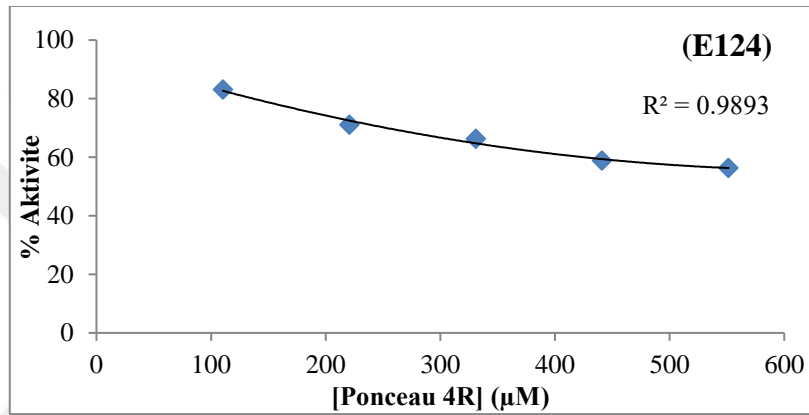
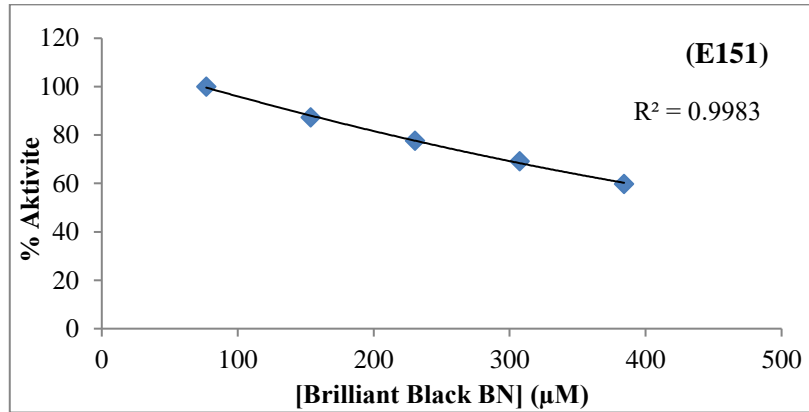
hCAII izoenzimi üzerine inhibisyon etkisine sahip olan her bir gıda katkı maddesi için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi (Şekil 93). Çizilen grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) (Şekil 94) ve % inhibisyon (Şekil 95) değerleri hesaplandı. % İnhibisyon değerleri gıda katkı maddelerinin 2 mg/mL (son konsantrasyon 0.067 mg/mL)'de göstermiş oldukları inhibisyon değerleri kullanılarak verilmiştir.



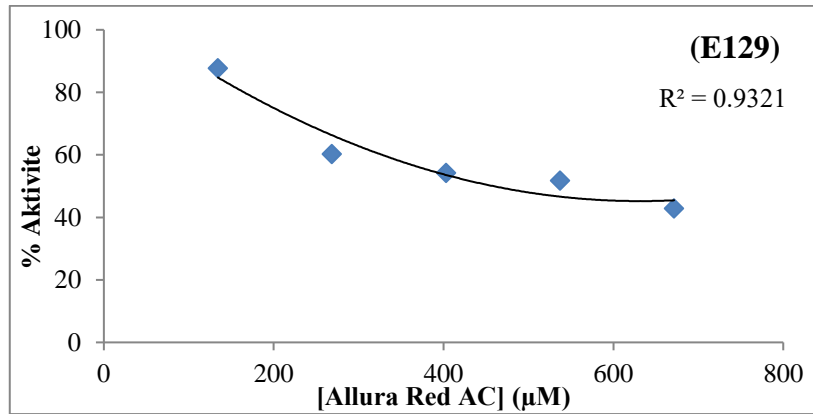
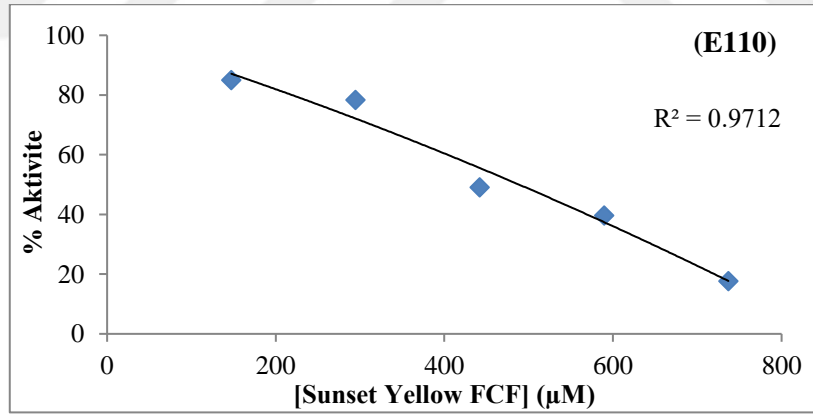
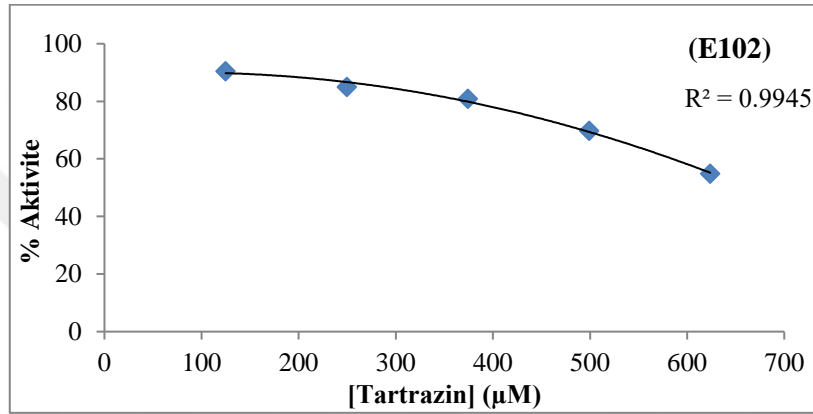
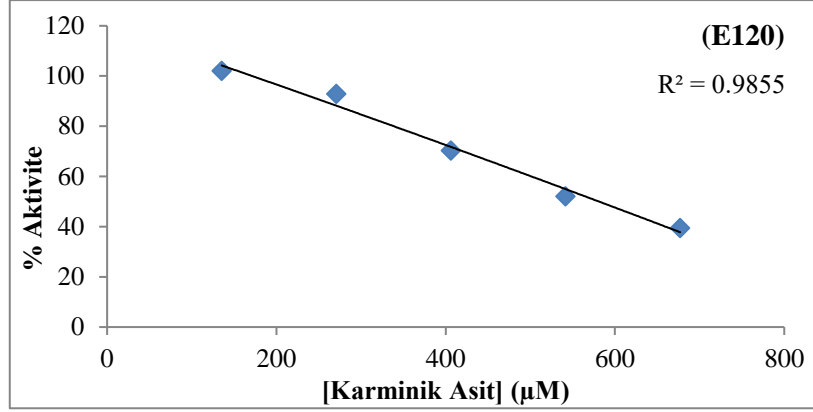


Şekil 93. hCAII enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan 20 farklı gıda katkı maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

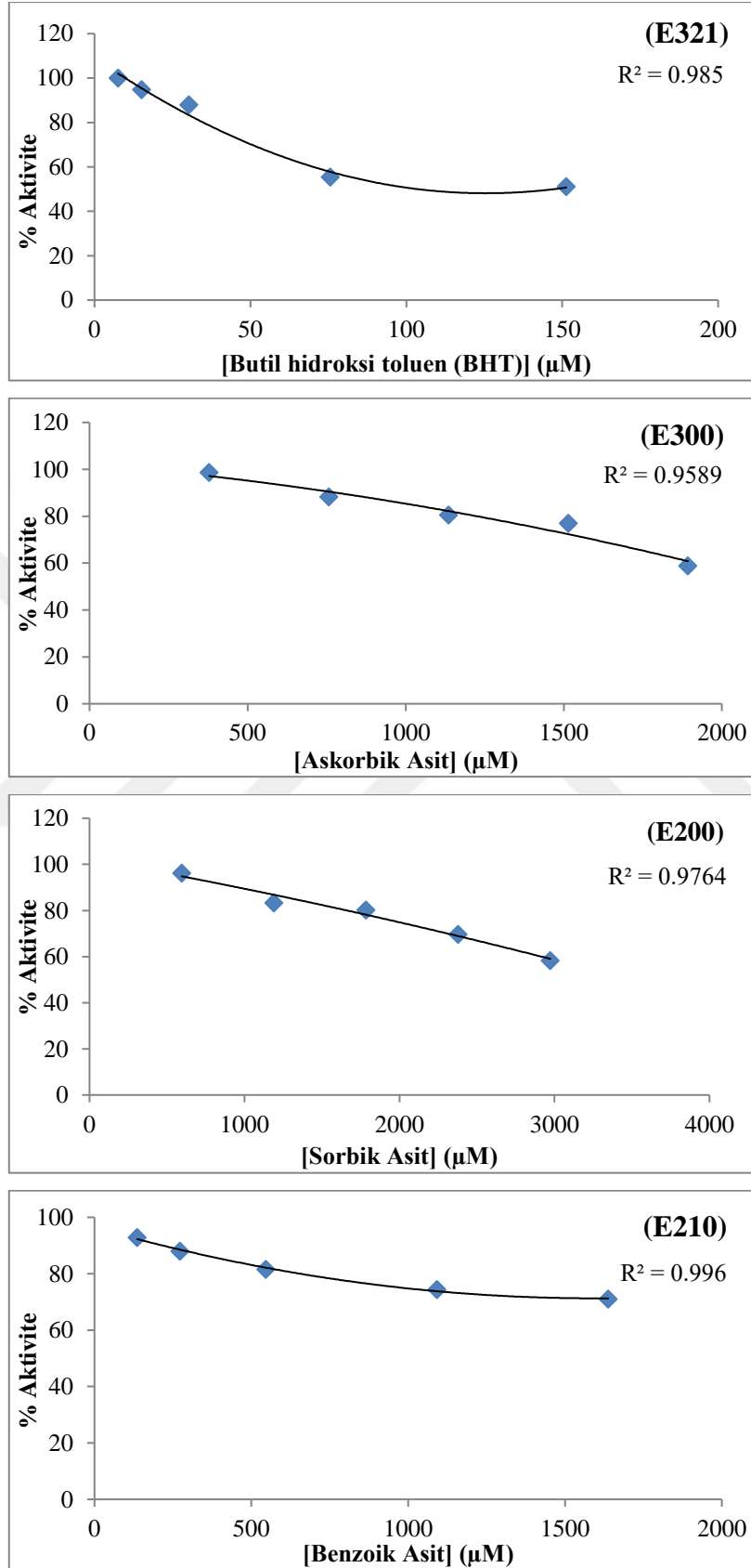
Şekil 93'ün devamı



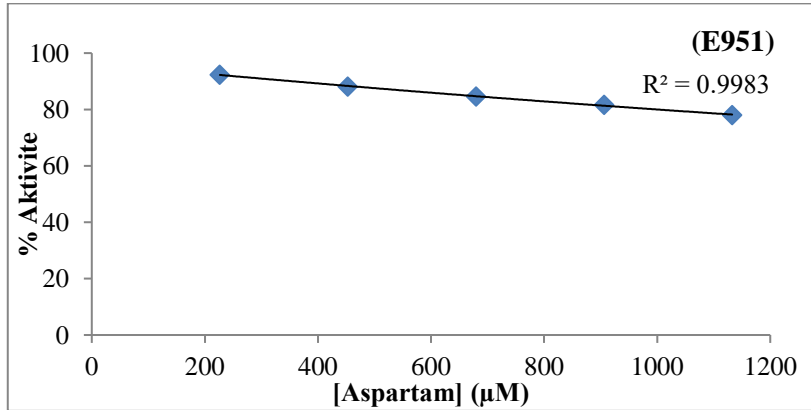
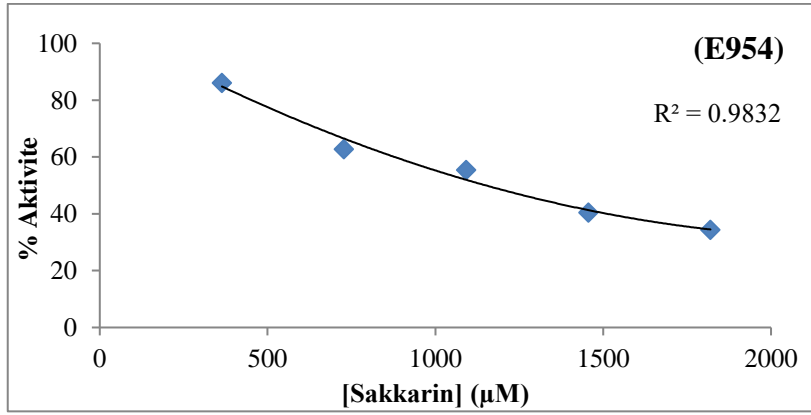
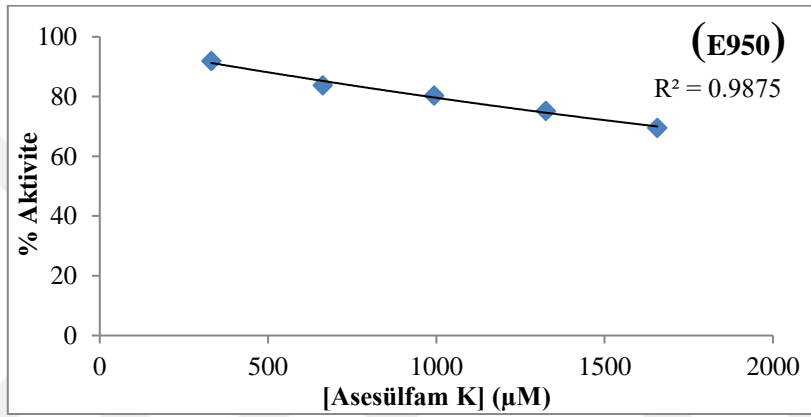
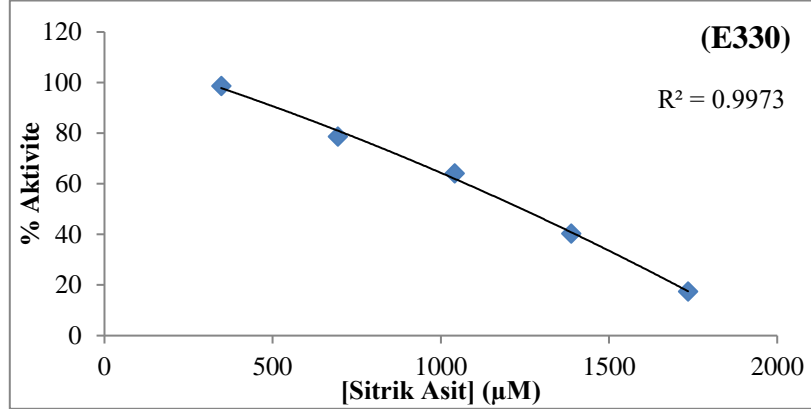
Şekil 93'ün devamı

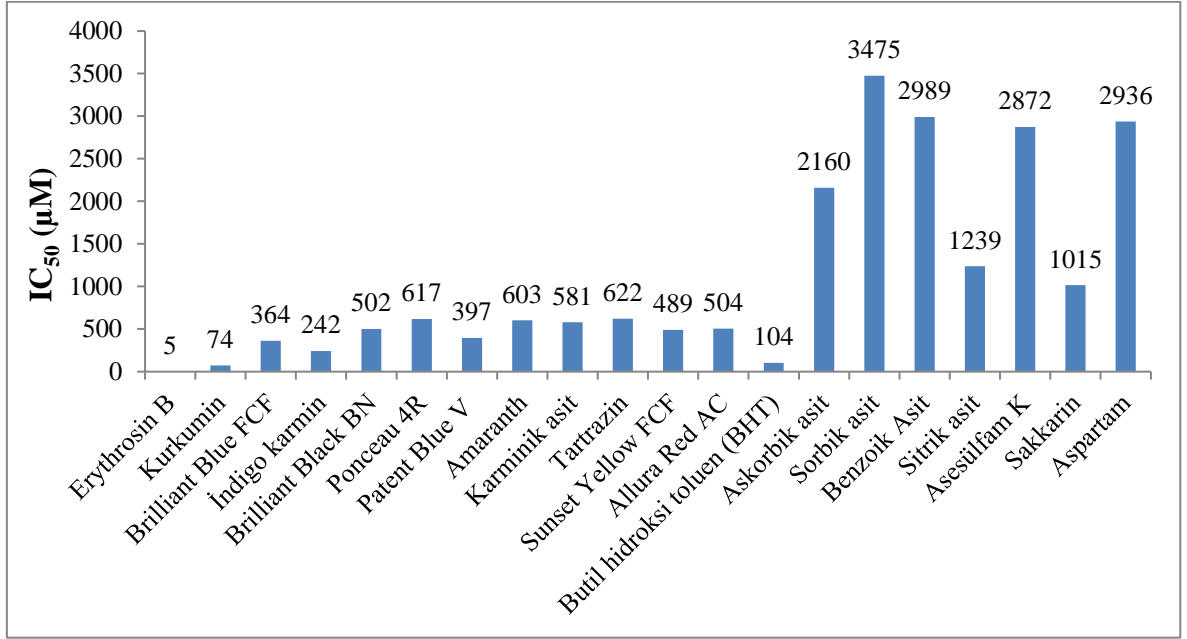


Şekil 93'ün devamı

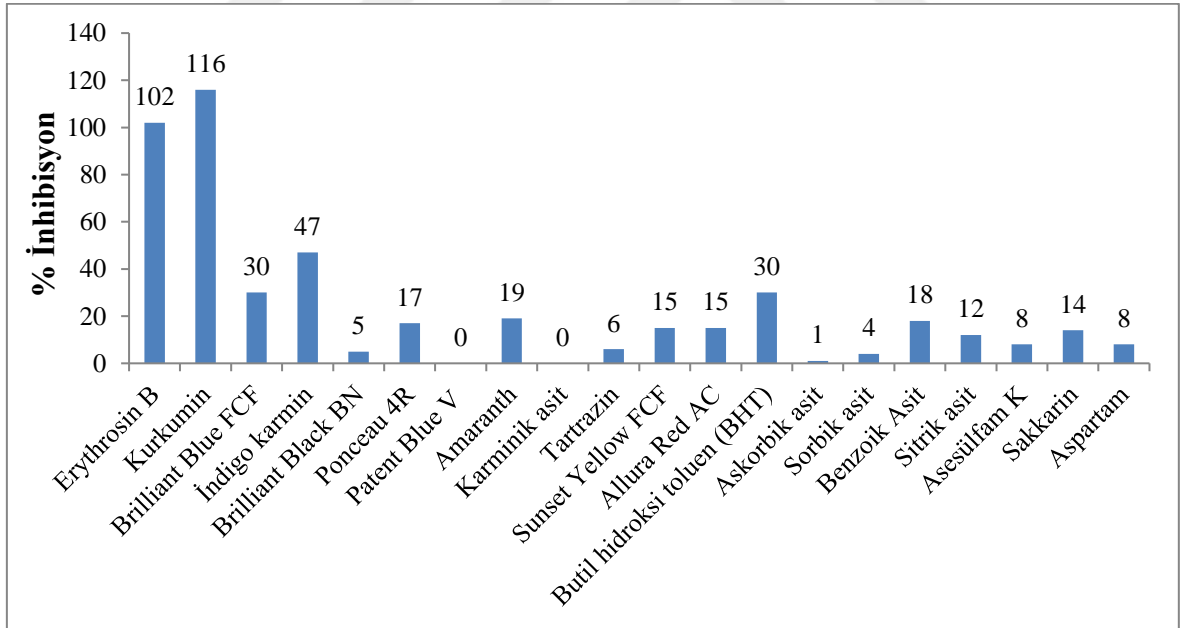


Şekil 93'ün devamı





Şekil 94. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin IC₅₀ (µM) değerleri

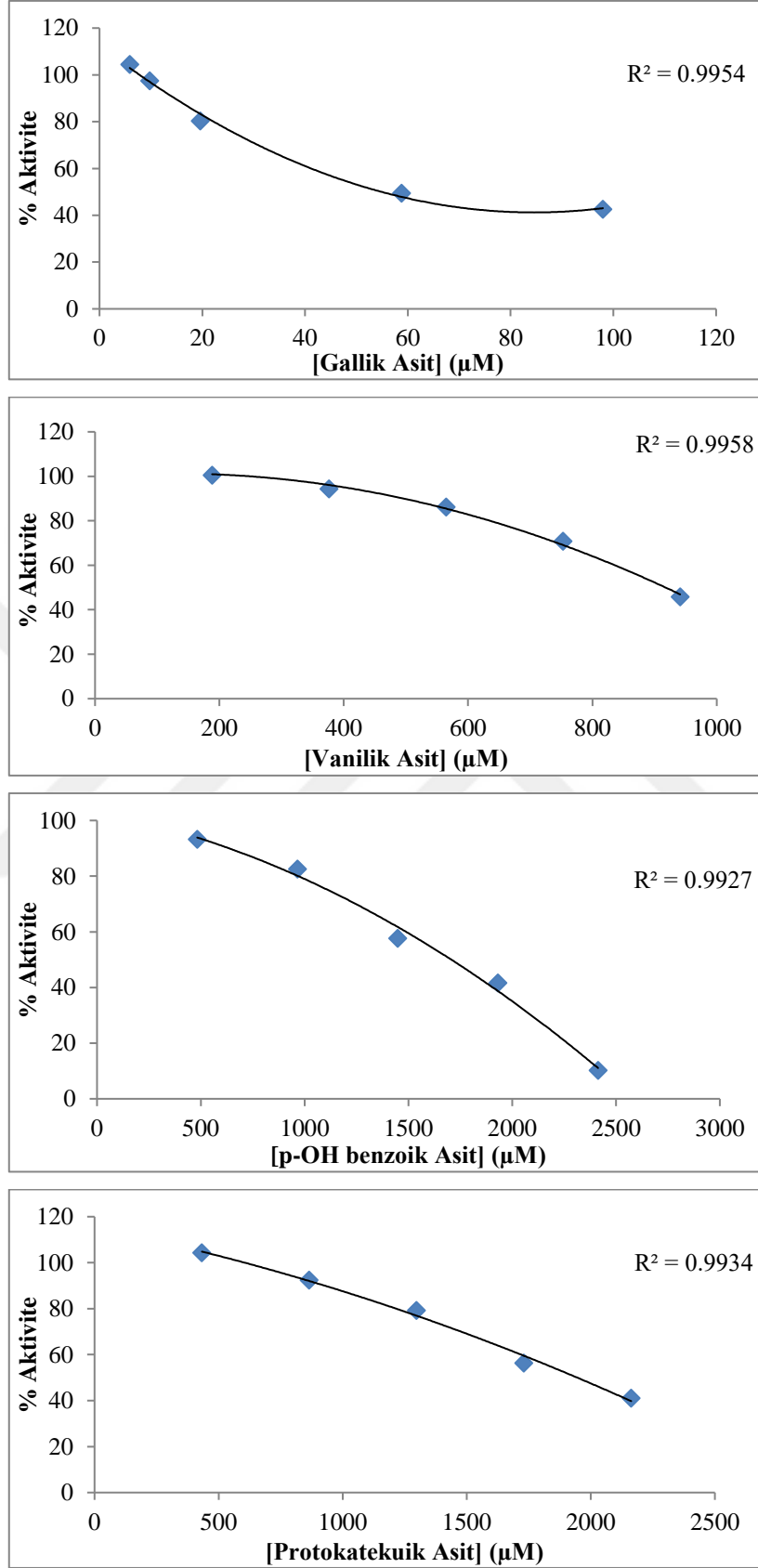


Şekil 95. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 20 farklı gıda katkı maddesinin 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri

3.5. Fenolik Bileşiklerin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkileri

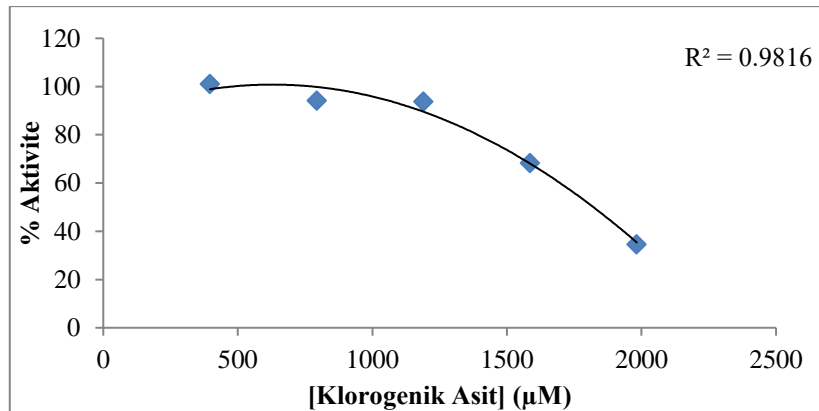
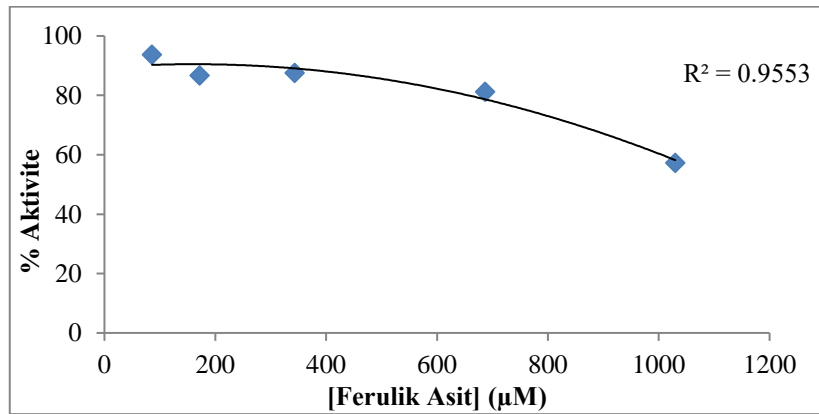
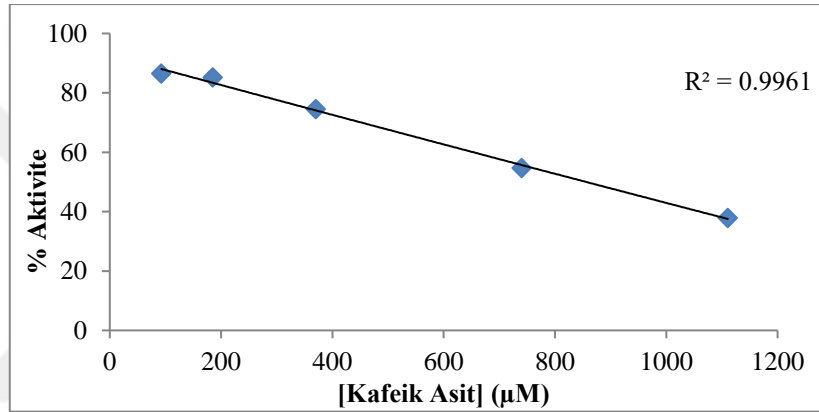
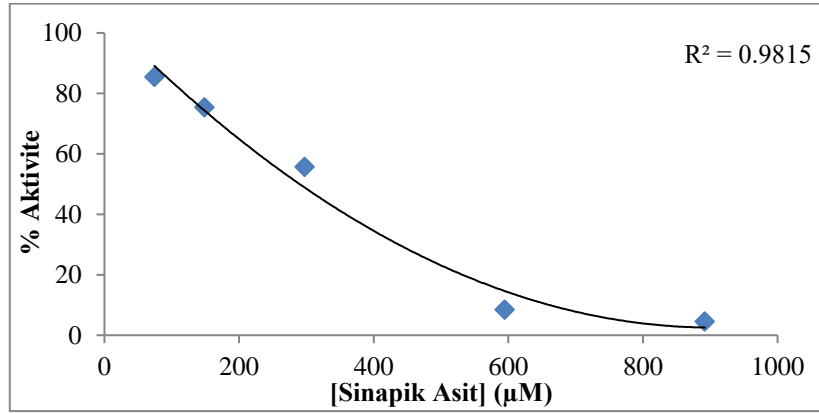
3.5.1. Fenolik Bileşiklerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri

3 mM'lık doymuş substrat konsantrasyonunda sığır karbonik anhidraz (BCA) enziminin esteraz aktivite üzerinde gallik asit, vanilik asit, *p*-OH benzoik asit, protokatekuik asit, sinapik asit, kafeik asit, ferulik asit, klorojenik asit, protokatekualdehit, vanilin, siringaldehit, kateşin, siringik asit ve rozmarinik asit 14 farklı fenolik bileşiğin inhibisyon etkisi araştırıldı. Aynı zamanda rozmarinik asitin hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerine etkisi araştırıldı. Herbir fenolik bileşik için hazırlanan beş farklı konsantrasyonda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisine sahip olan her bir fenolik bileşik için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu[I] grafikleri çizildi (Şekil 96). Çizilen grafiklerden % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) (Şekil 97) ve % inhibisyon değerleri (Şekil 98) hesaplandı.

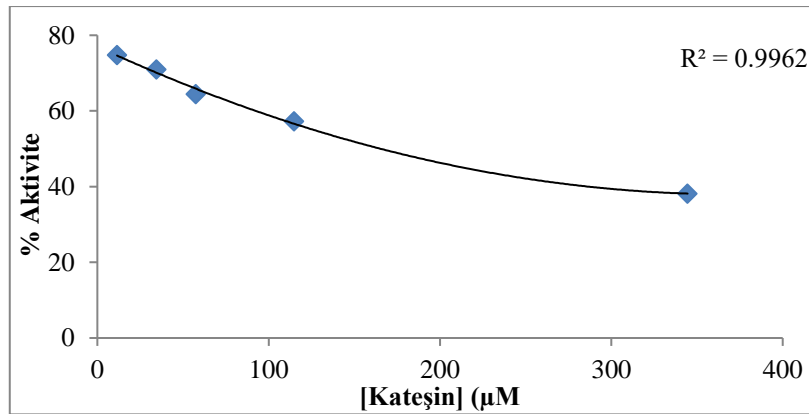
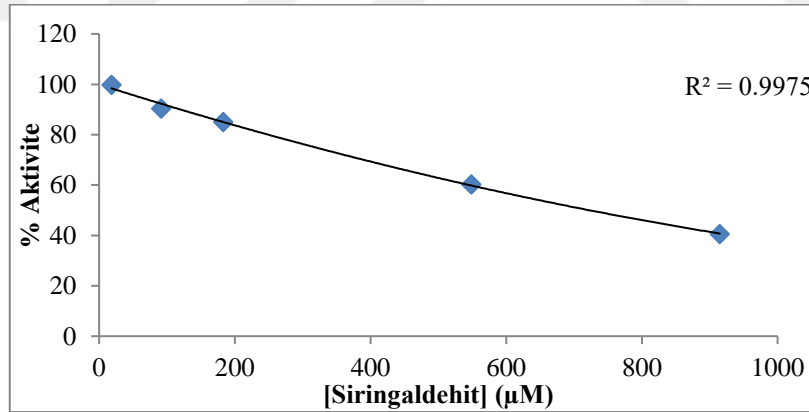
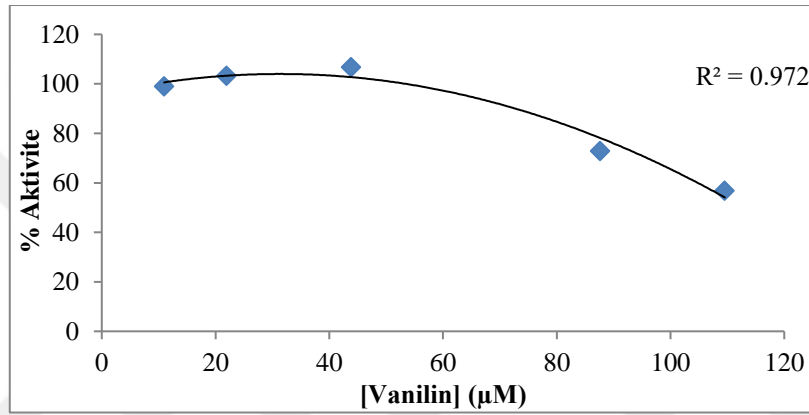
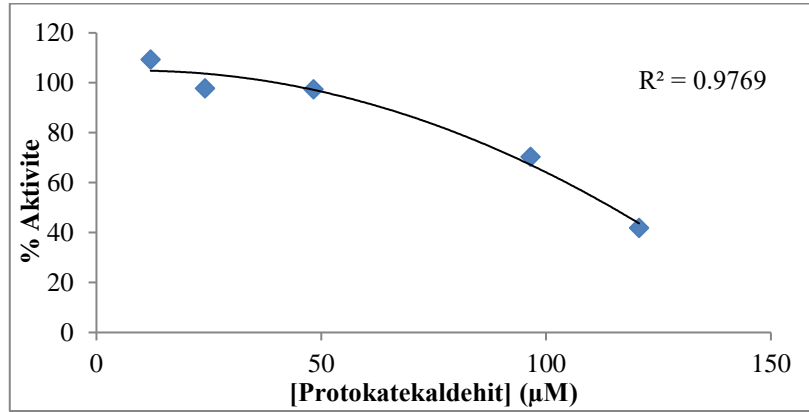


Şekil 96. BCA enziminin esterase aktivite üzerine çalışılan 14 farklı fenolik standardın IC_{50} değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

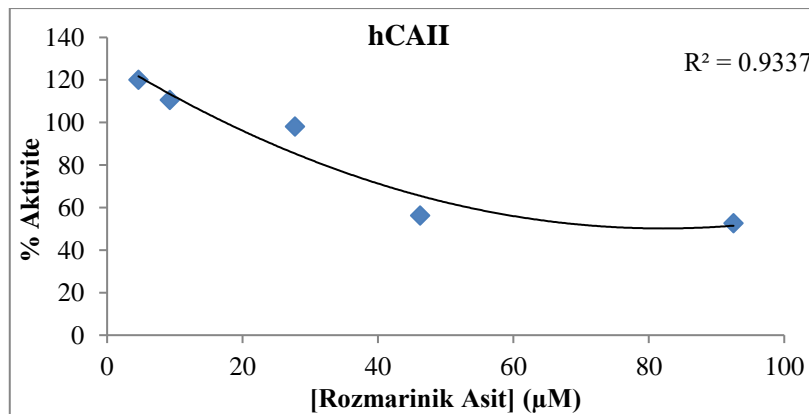
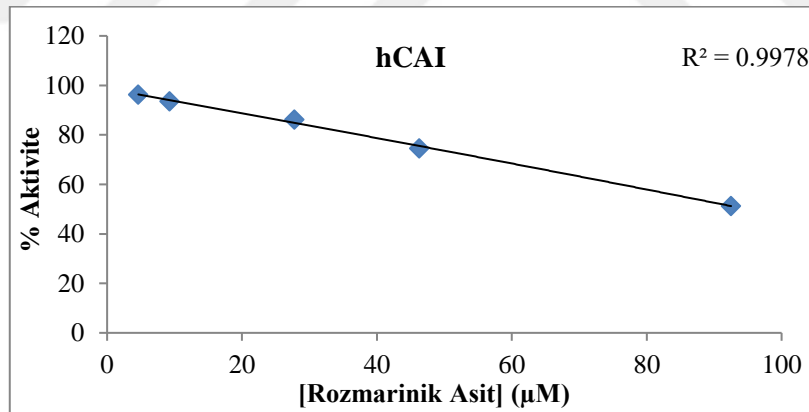
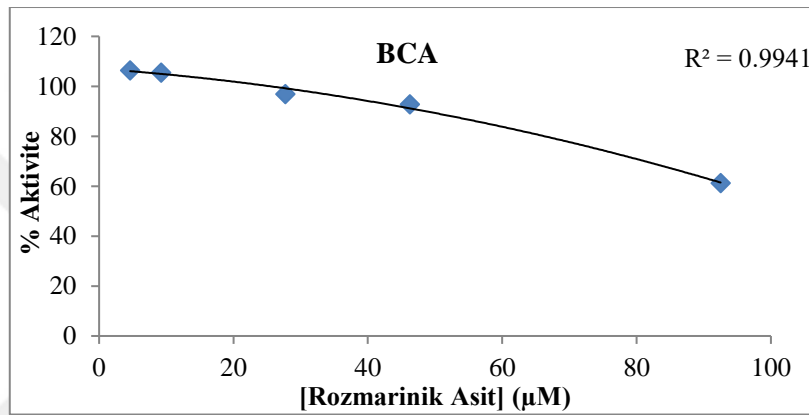
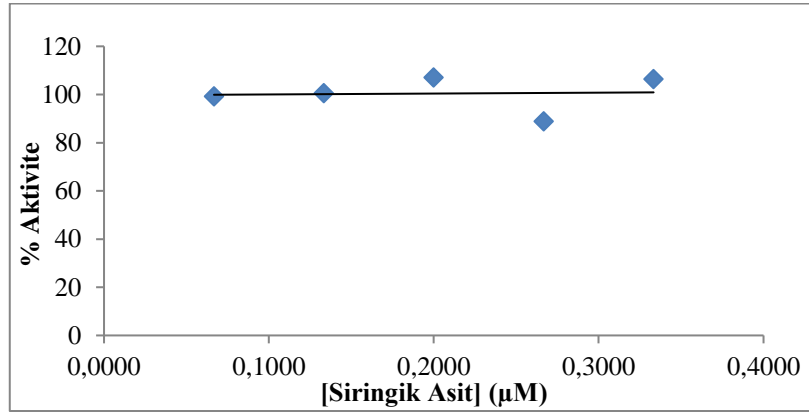
Şekil 96'nın devamı

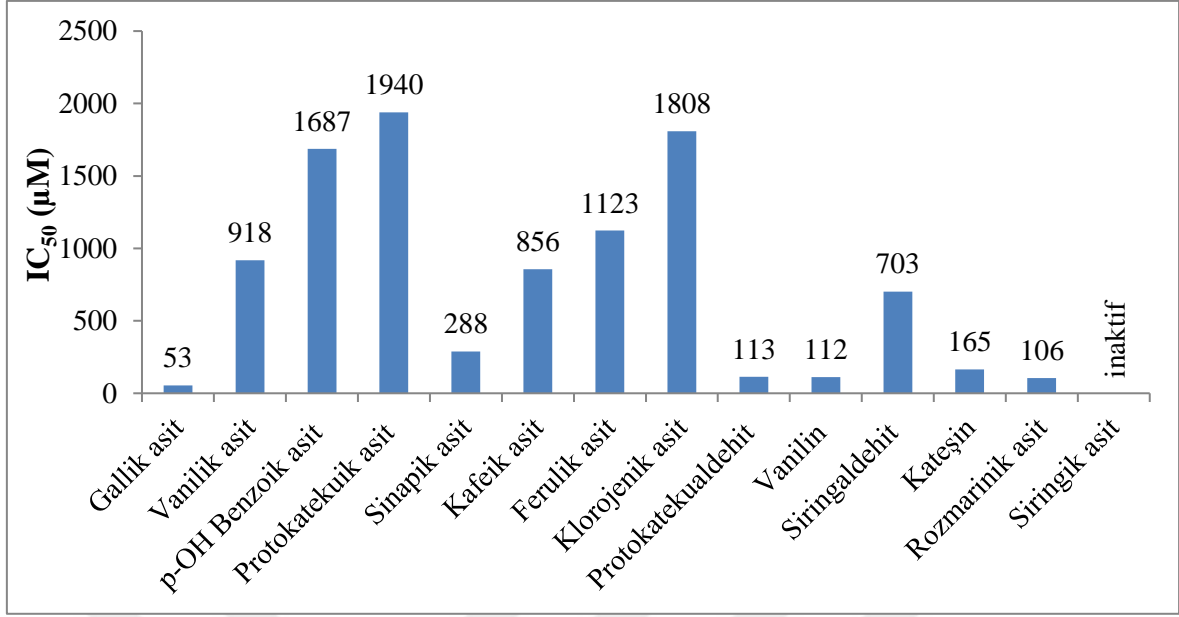


Şekil 96'nın devamı

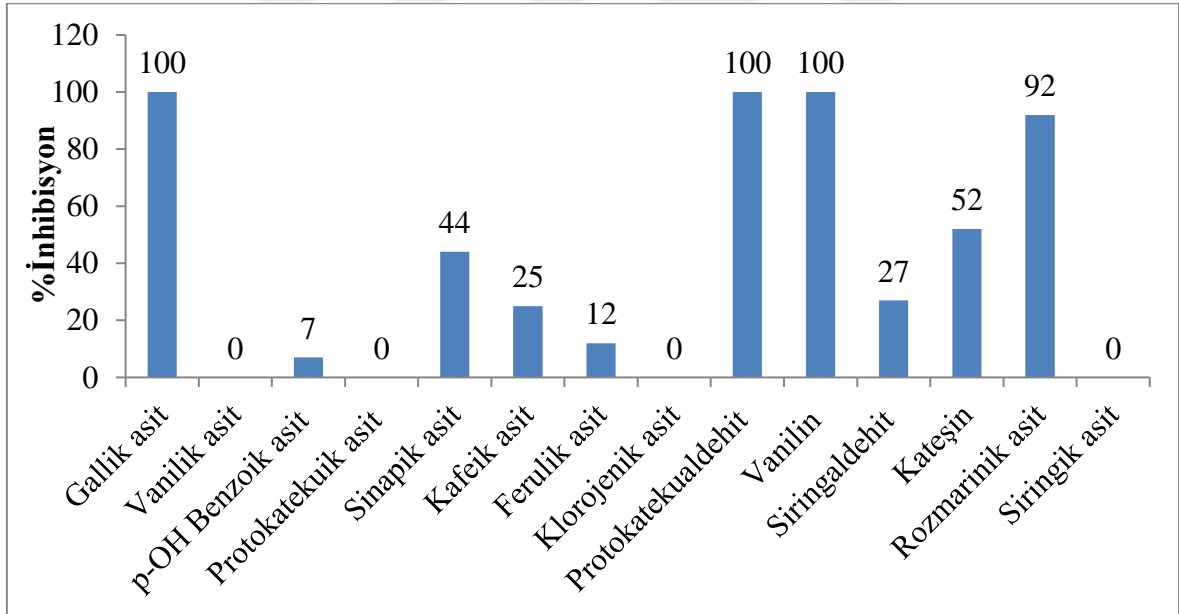


Şekil 96'nın devamı





Şekil 97. BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 14 fenolik bileşiğin IC₅₀ (µM) değerleri

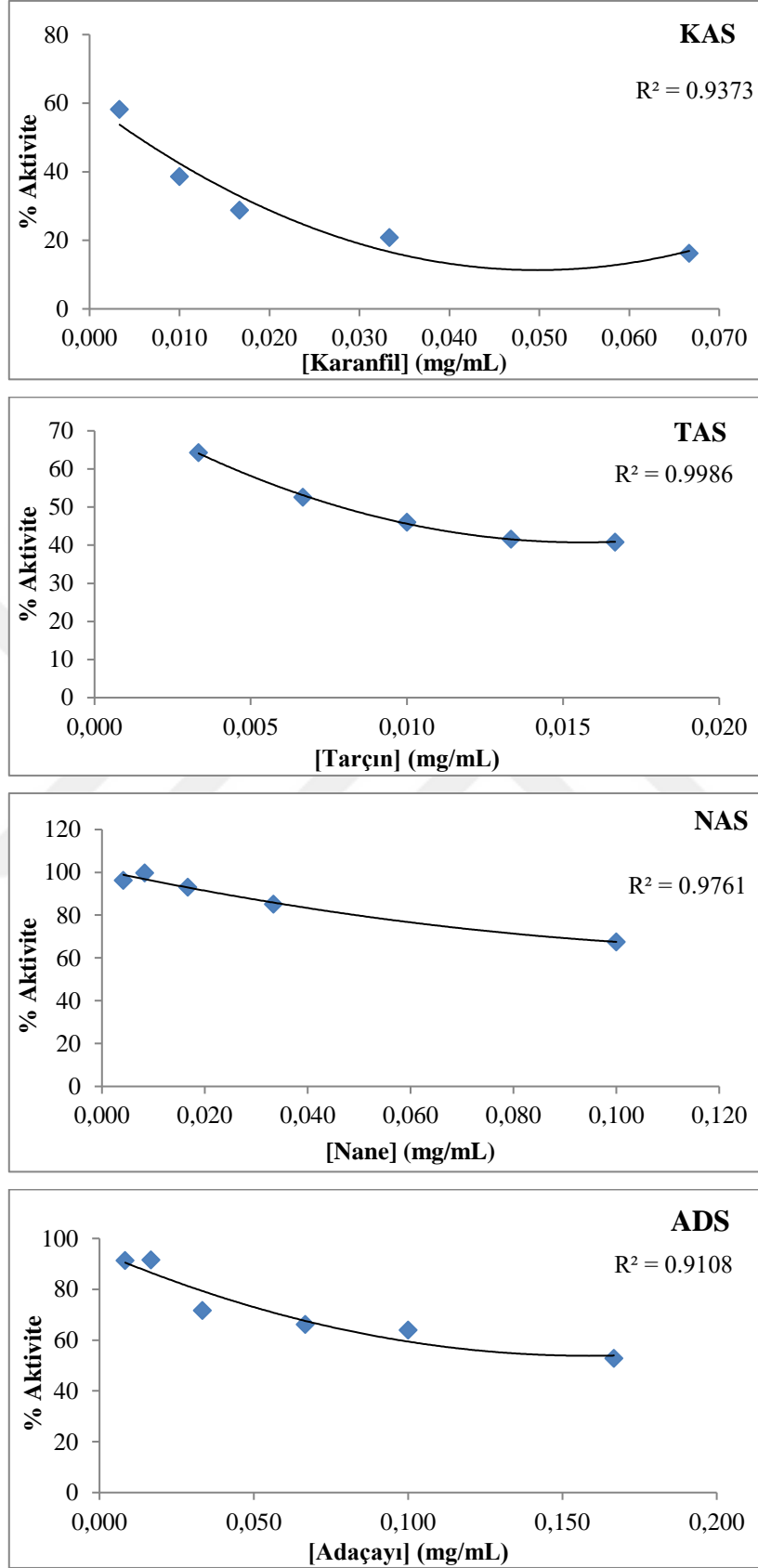


Şekil 98. BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen 14 fenolik bileşiğin 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri

3.6. ay Ekstraktlarının Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkileri

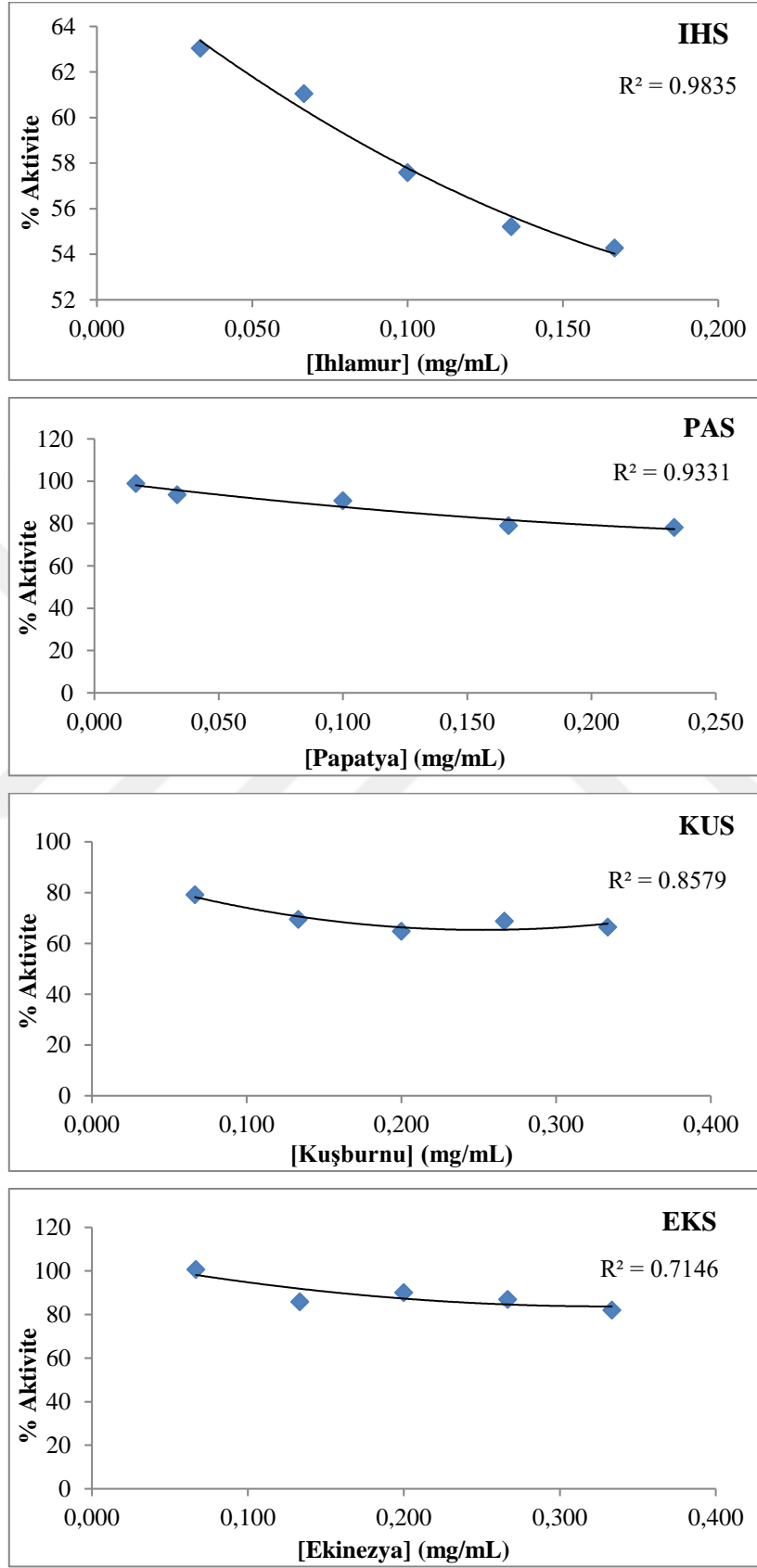
3.6.1. ay Ekstraktlarının BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri

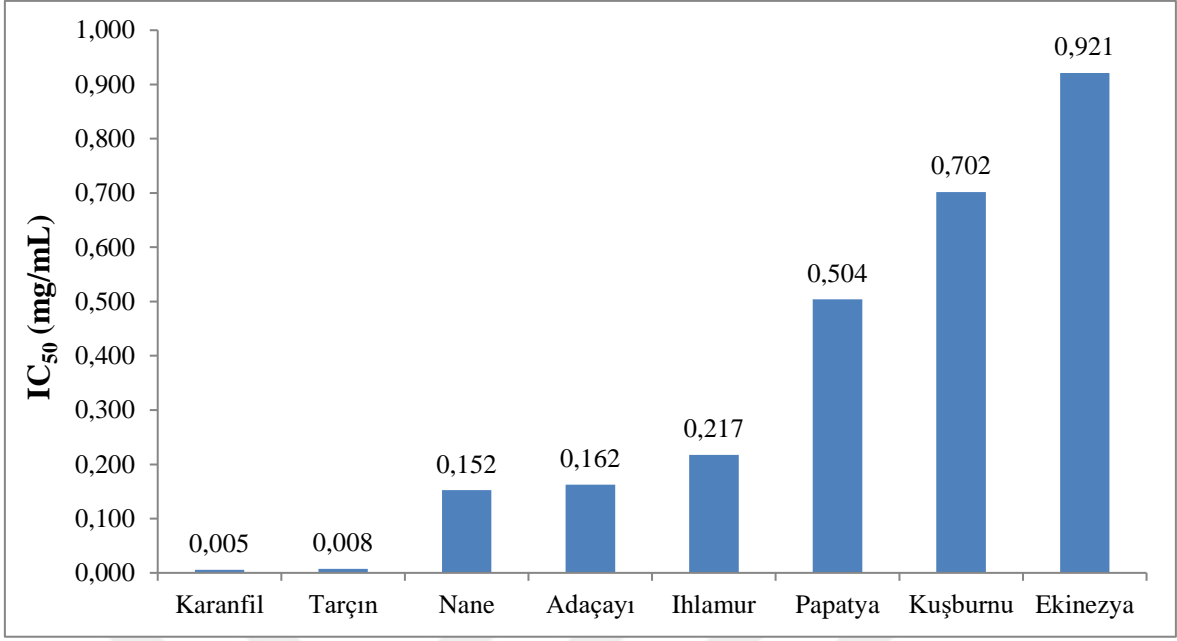
3 mM'lık doymun substrat konsantrasyonunda sığır karbonik anhidraz (BCA) enziminin esteraz aktivite üzerinde çay ekstraktlarının inhbisyon etkisi araştırıldı. Herbir ay ekstraktı için hazırlanan beş farklı konsantrasyonda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisine sahip olan her bir bitkisel çay ekstraktı için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi (Şekil 99). Çizilen grafiklerden %50 inhbisyona sebep olan inhbitor konsantrasyonları (IC_{50}) (Şekil 100) ve % inhbisyon (Şekil 101) değerleri hesaplandı. İnhibisyon etkisine sahip olan diğer çay ekstraktları için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi (Şekil 102). Çizilen grafiklerden % 50 inhbisyona sebep olan inhbitor konsantrasyonları (IC_{50}) (Şekil 103) ve %inhbisyon (Şekil 104) değerleri hesaplandı.



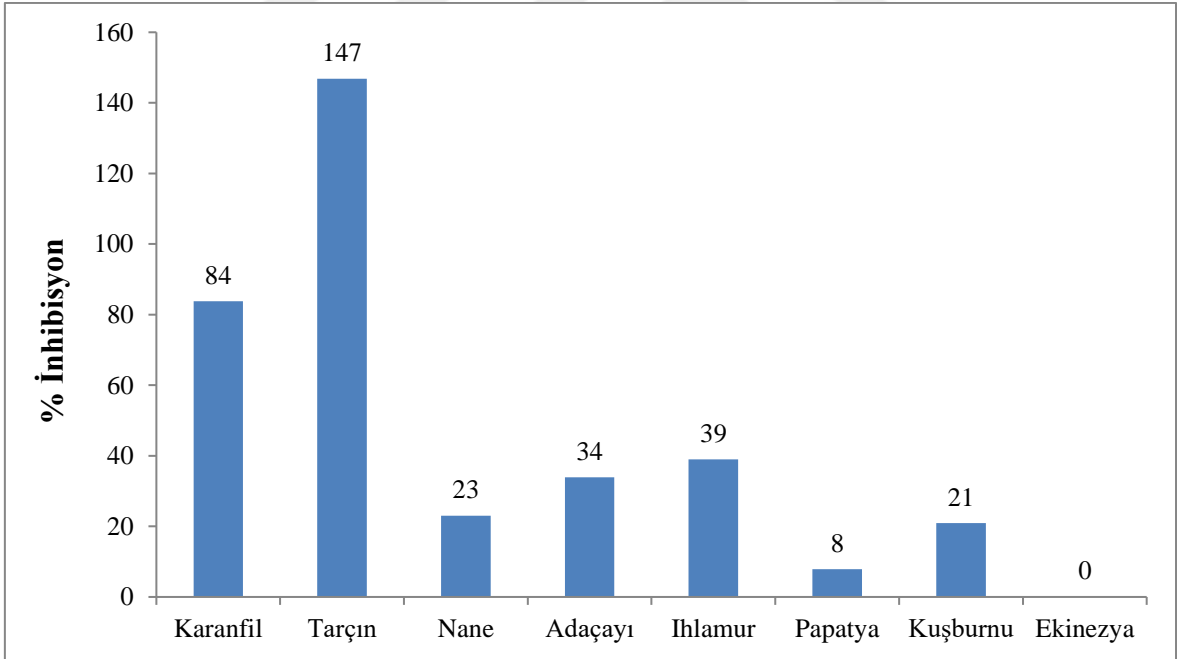
Şekil 99. BCA enziminin esterase aktivite üzerine çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC_{50} değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

Şekil 99'un devamı

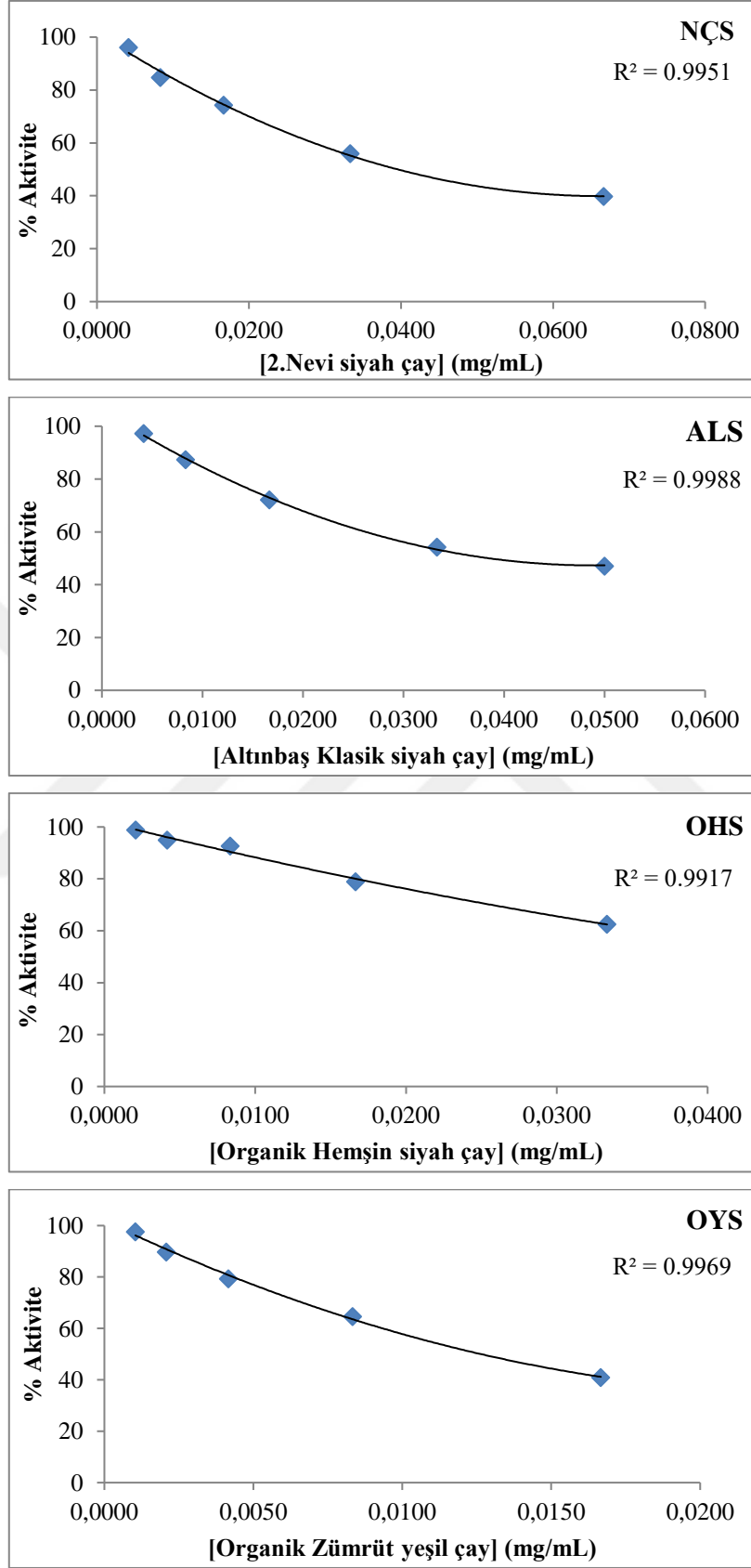




Şekil 100. BCA esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC₅₀ (mg/mL) değerleri

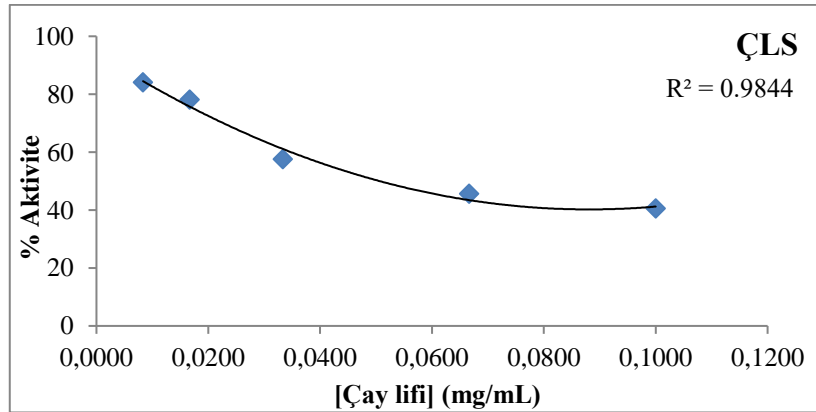
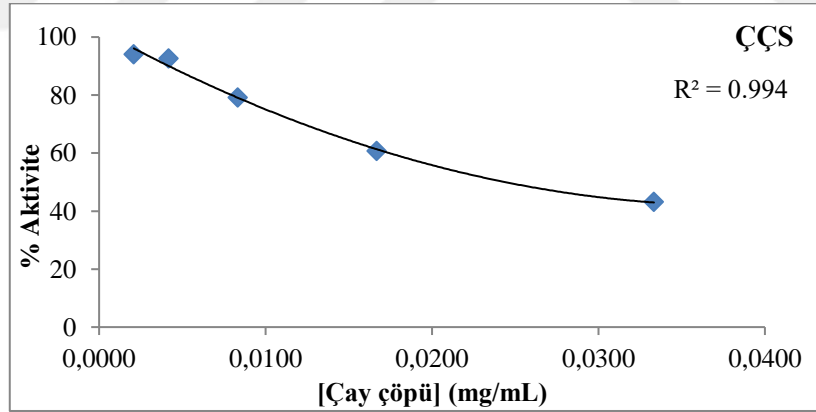
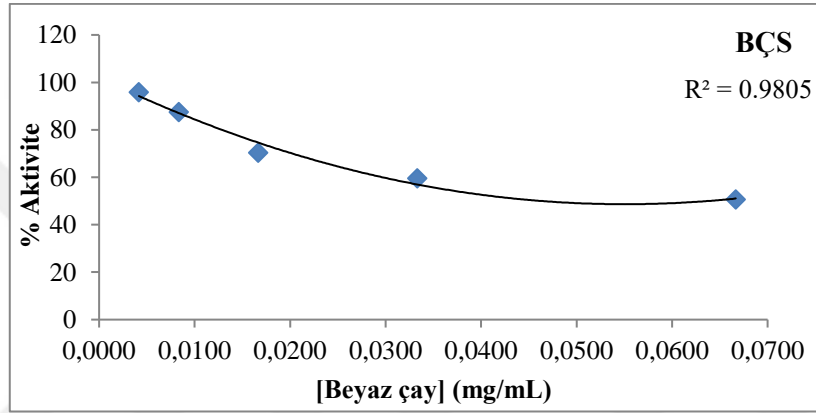
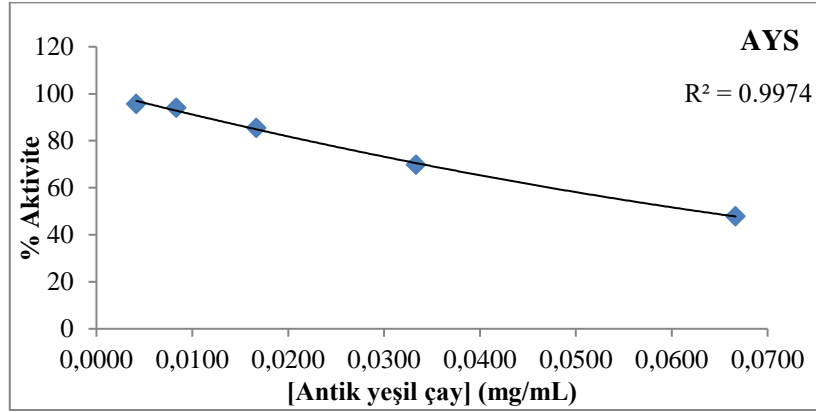


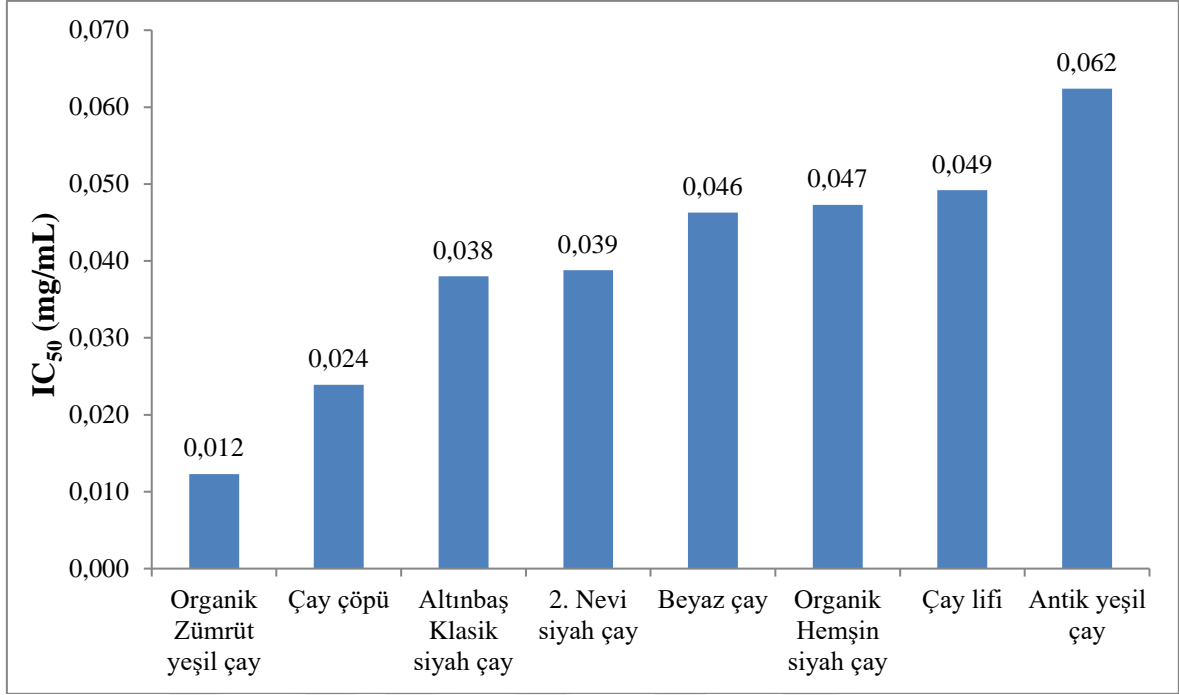
Şekil 101. BCA esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri



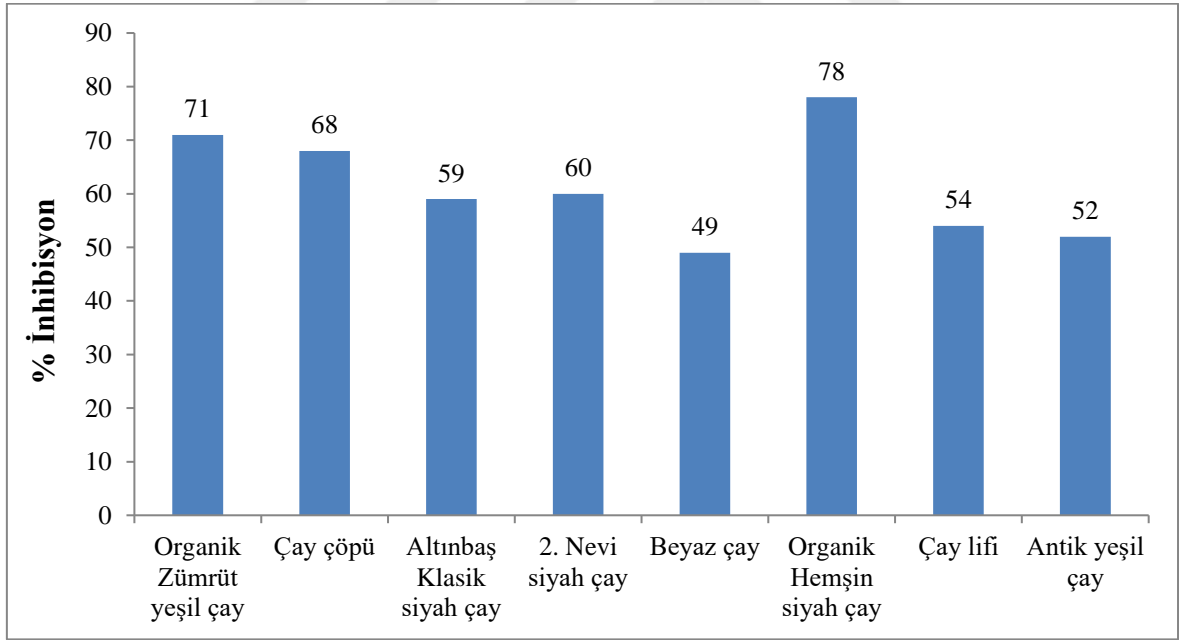
Şekil 102. BCA enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

Şekil 102'nin devamı





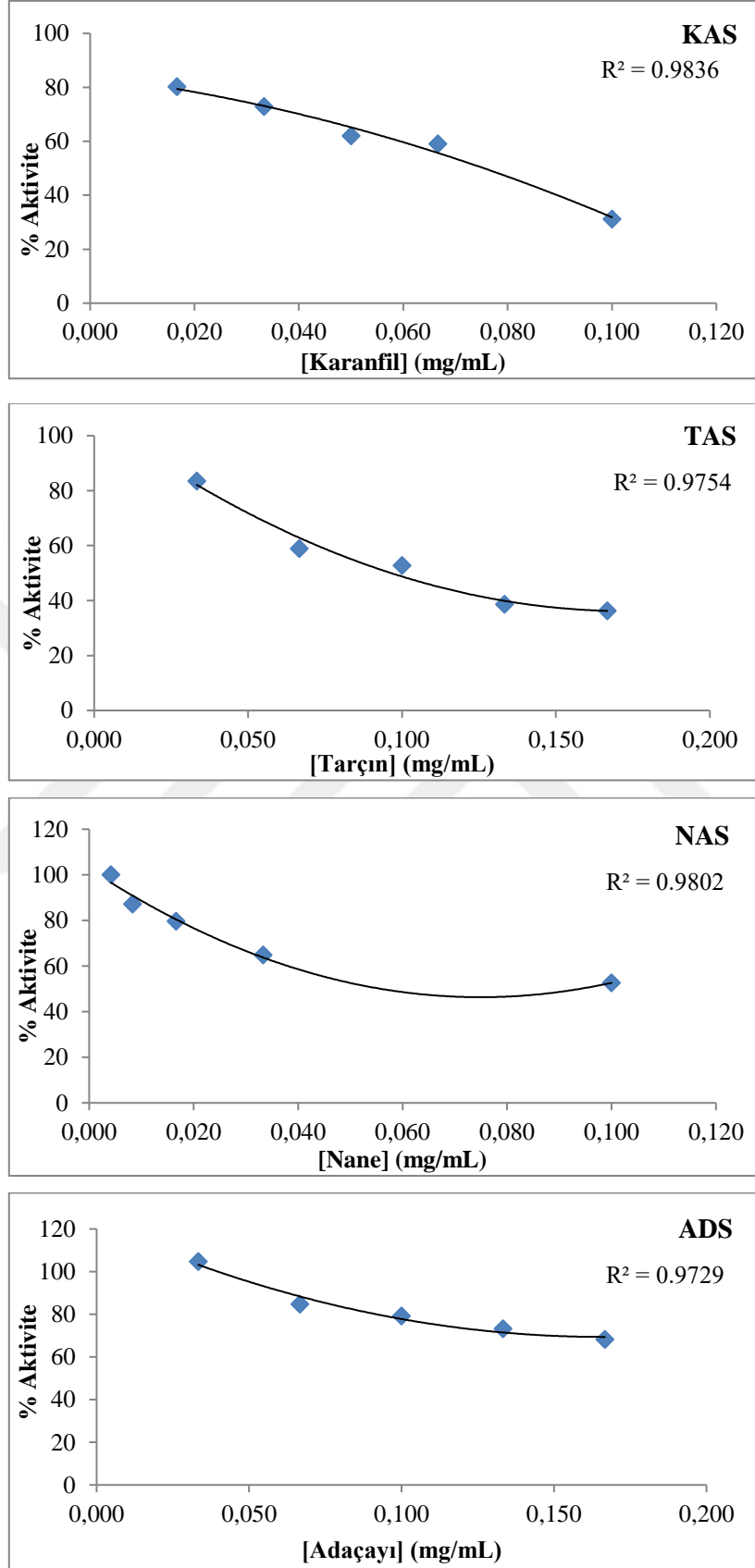
Şekil 103. BCA esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC₅₀ (mg/mL) değerleri



Şekil 104. BCA esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri

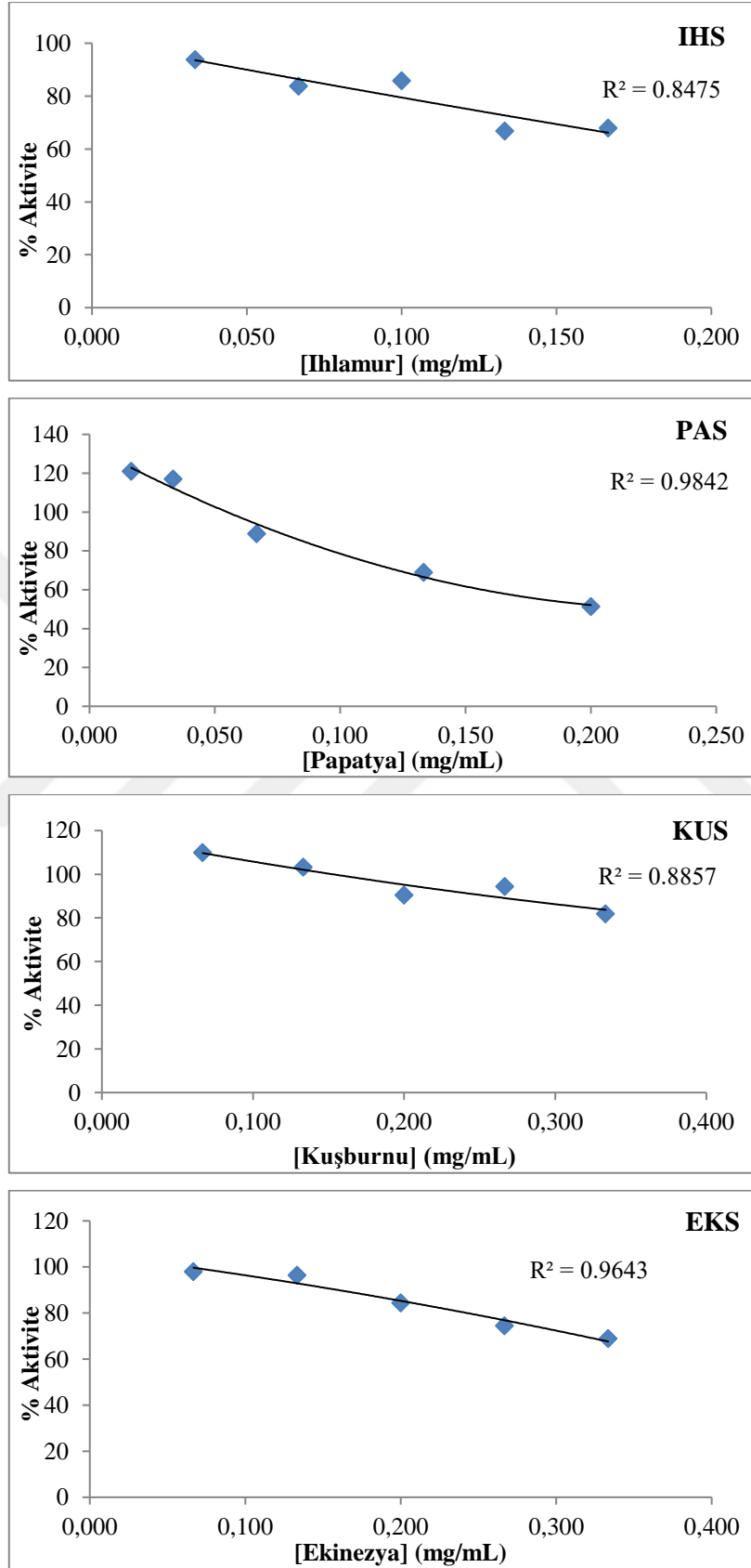
3.6.2. ay Ekstraktlarının hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri

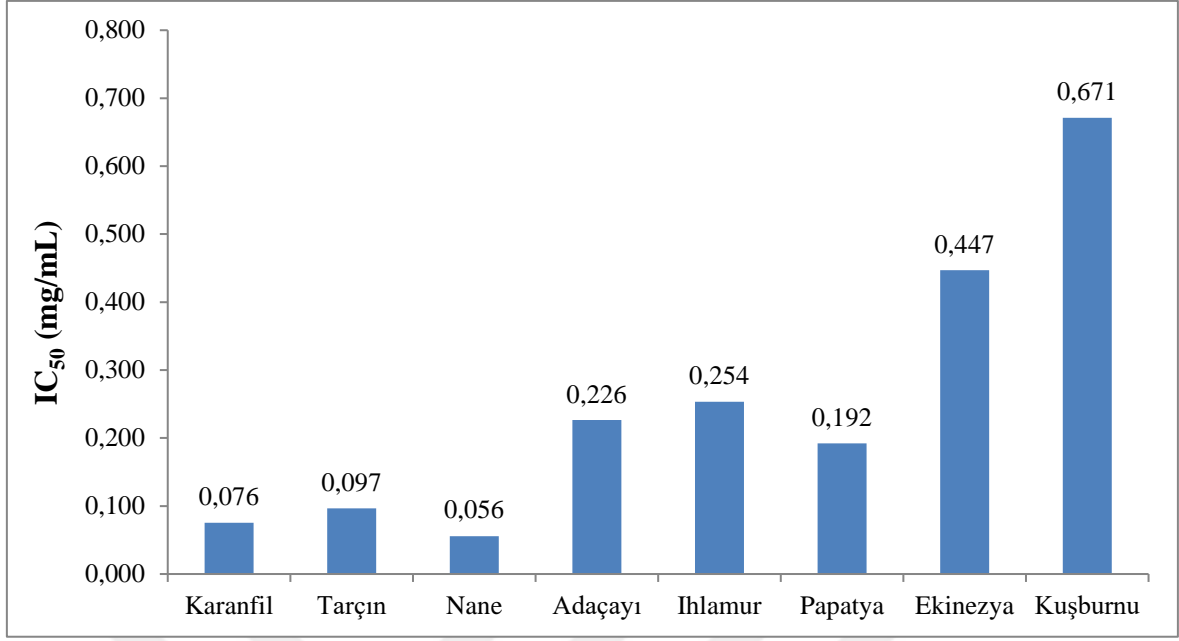
3 mM'lık doygun substrat konsantrasyonunda saflaştırılan hCAI ve hCAII izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerine çay ekstraktlarının inhibisyon etkisi araştırıldı. Bunun için her bir çay ekstraktı beş farklı konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon etkisine sahip olan her bir bitkisel çay ekstraktı için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi (şekil 105). Çizilen grafiklerden % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) (şekil 106) ve %inhibisyon (şekil 107) değerleri hesaplandı. % İnhibisyon değerleri çay ekstraktlarının 2 mg/mL (son konsantrasyon 0.067 mg/mL)'de göstermiş oldukları inhibisyon değerleri kullanılarak verilmiştir. Aynı zamanda bu değerler diğer çay ekstraktları içinde sırasıyla şekil 107, şekil 108 ve şekil 109'da verilmiştir.



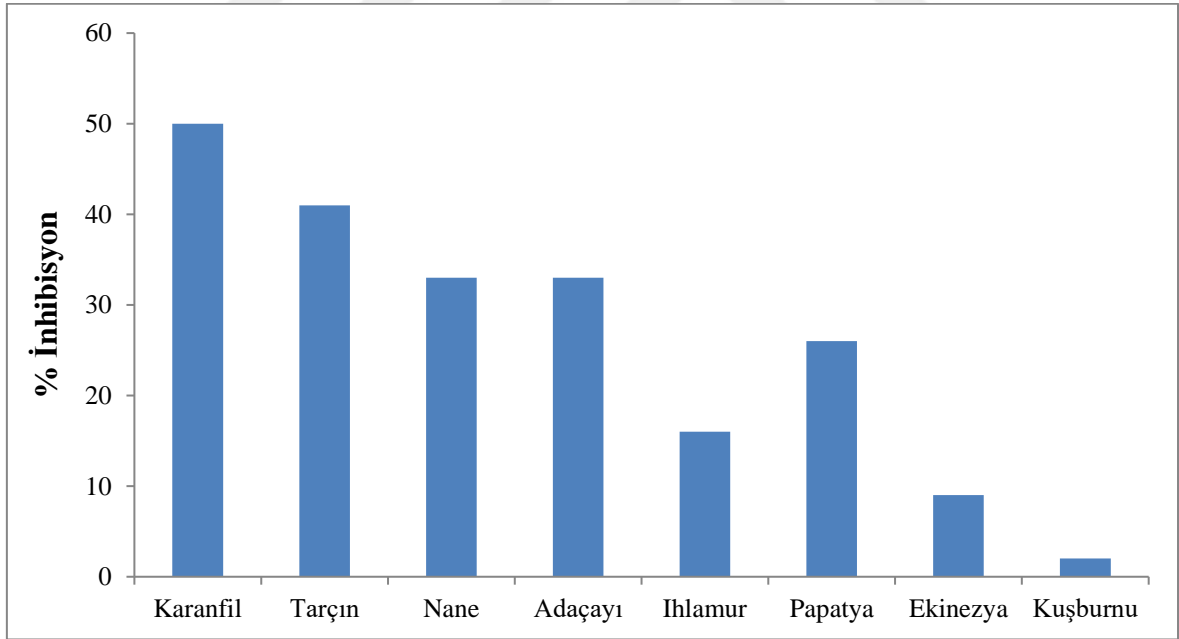
Şekil 105. hCAI enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC_{50} değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

Şekil 105'in devamı

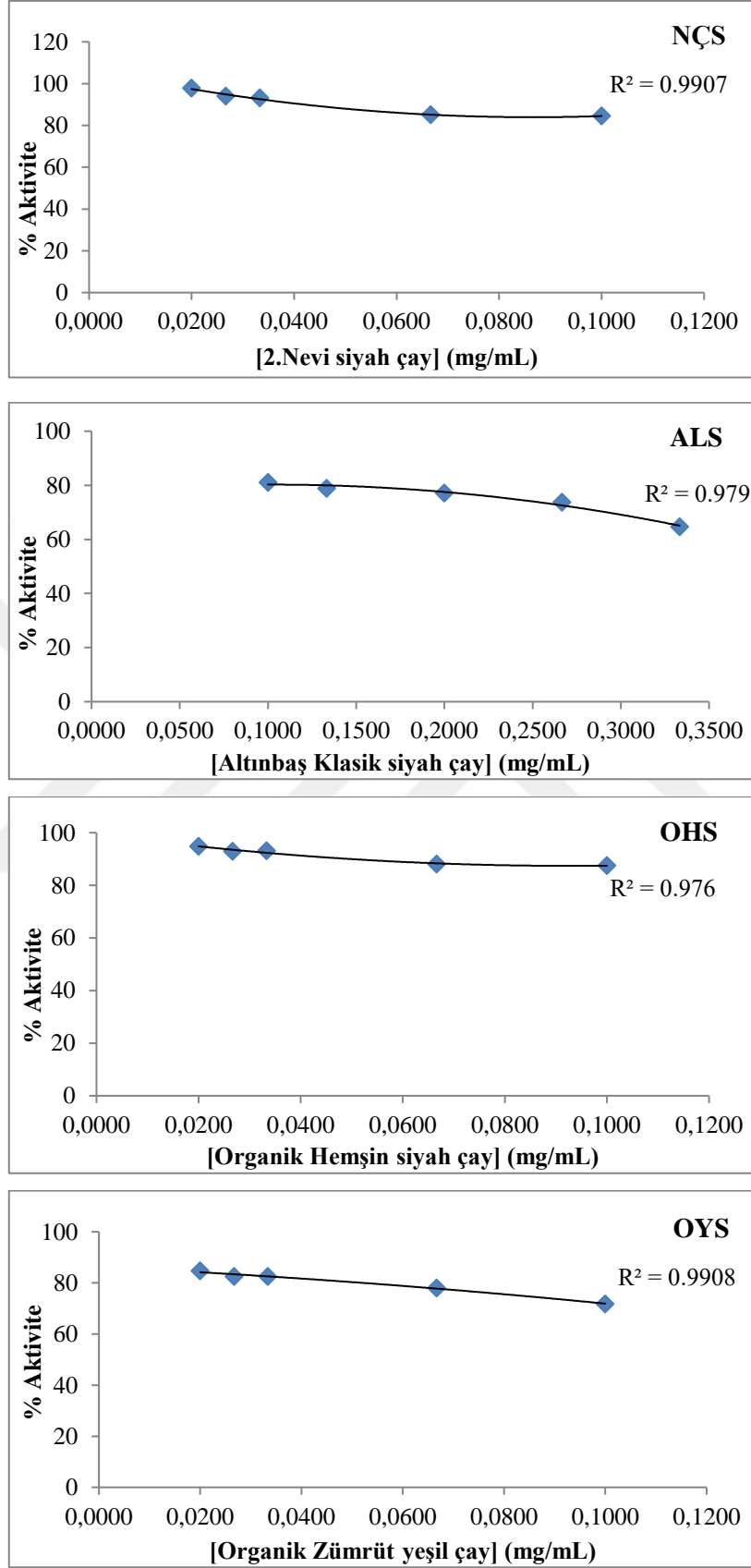




Şekil 106. hCAI esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC₅₀ (mg/mL) değerleri

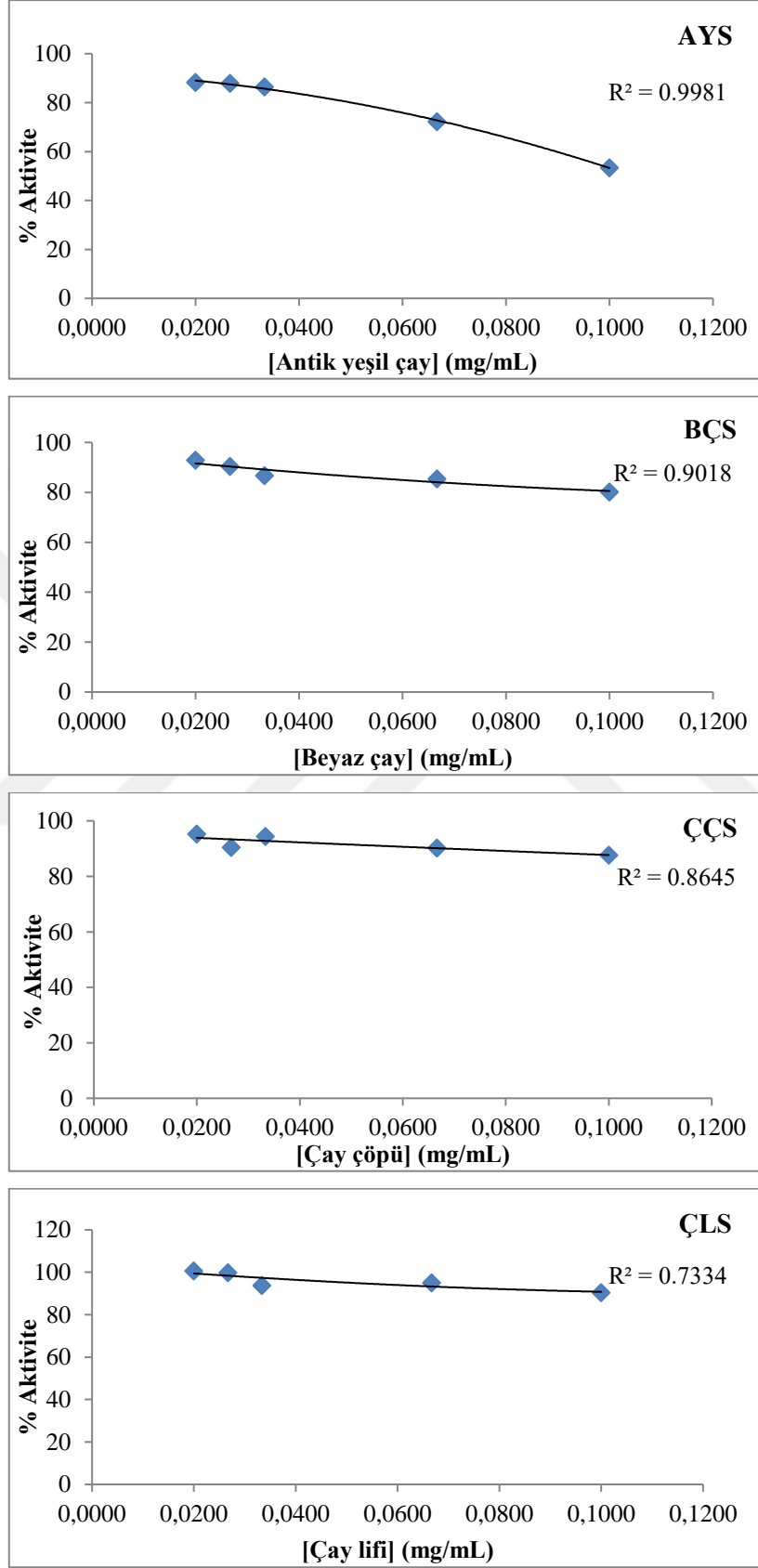


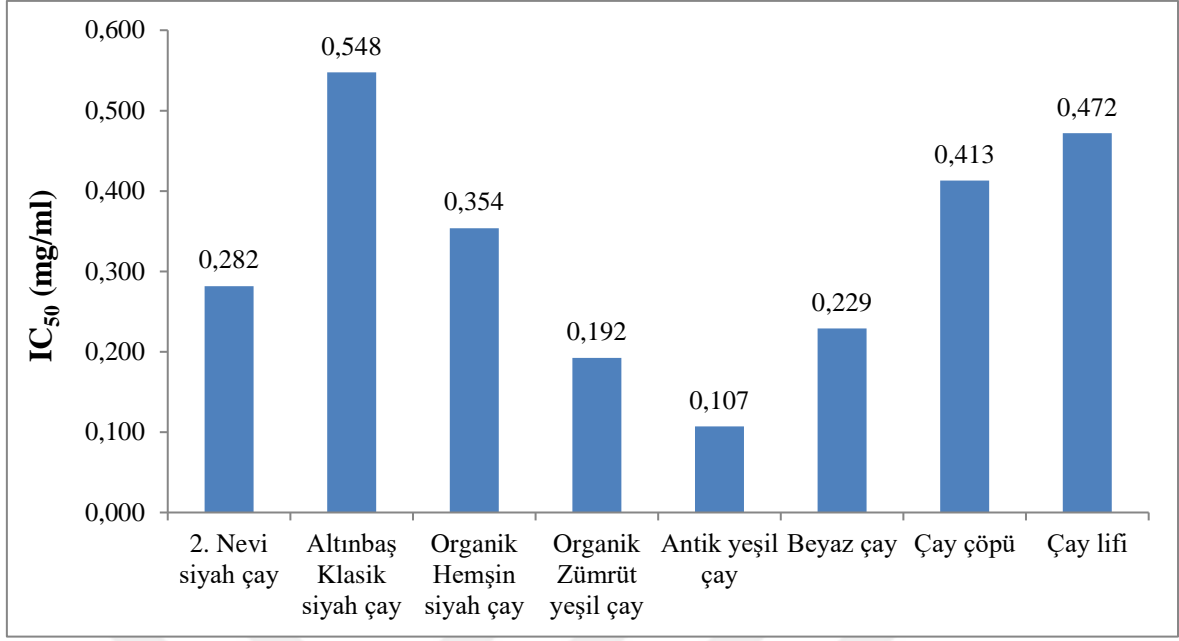
Şekil 107. hCAI esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri



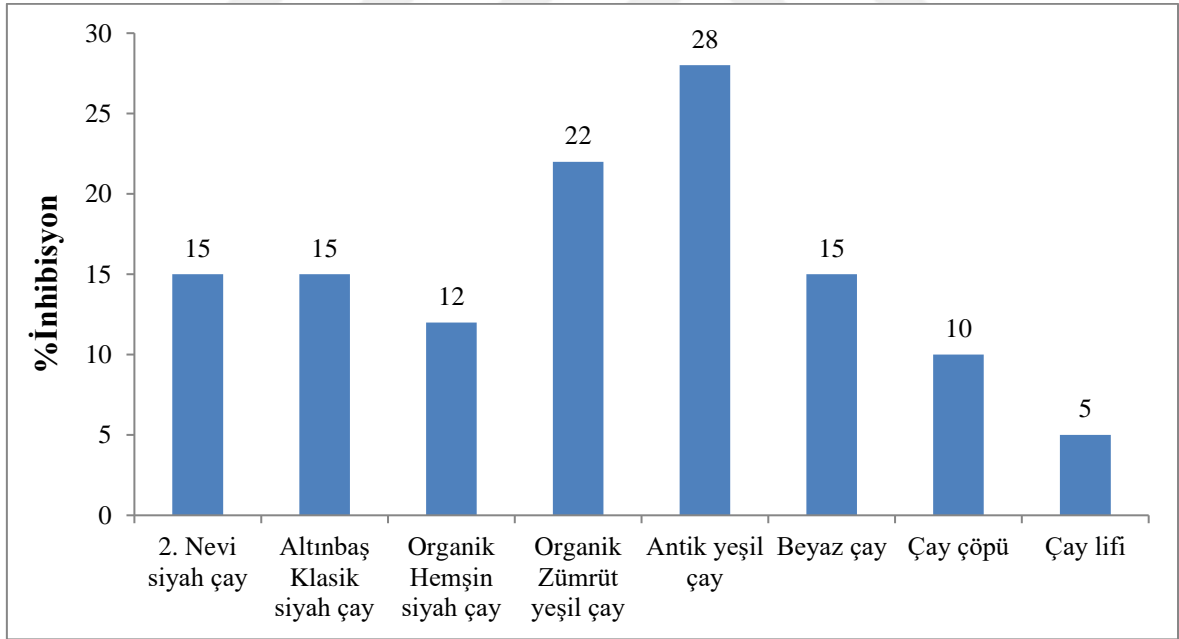
Şekil 108. hCAI enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

Şekil 108'in devamı





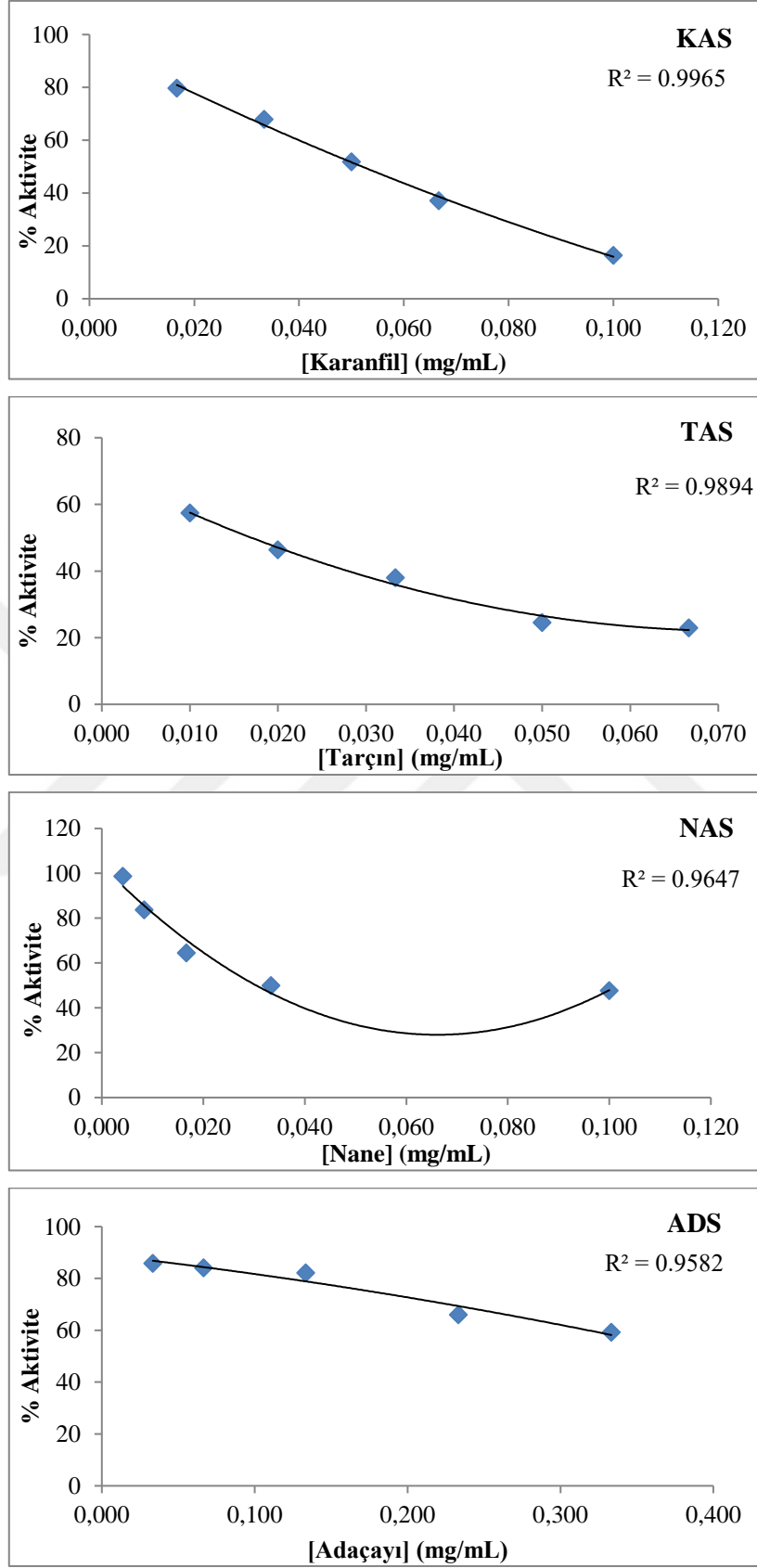
Şekil 109. hCAI esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC₅₀ (mg/mL) değerleri



Şekil 110. hCAI esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri

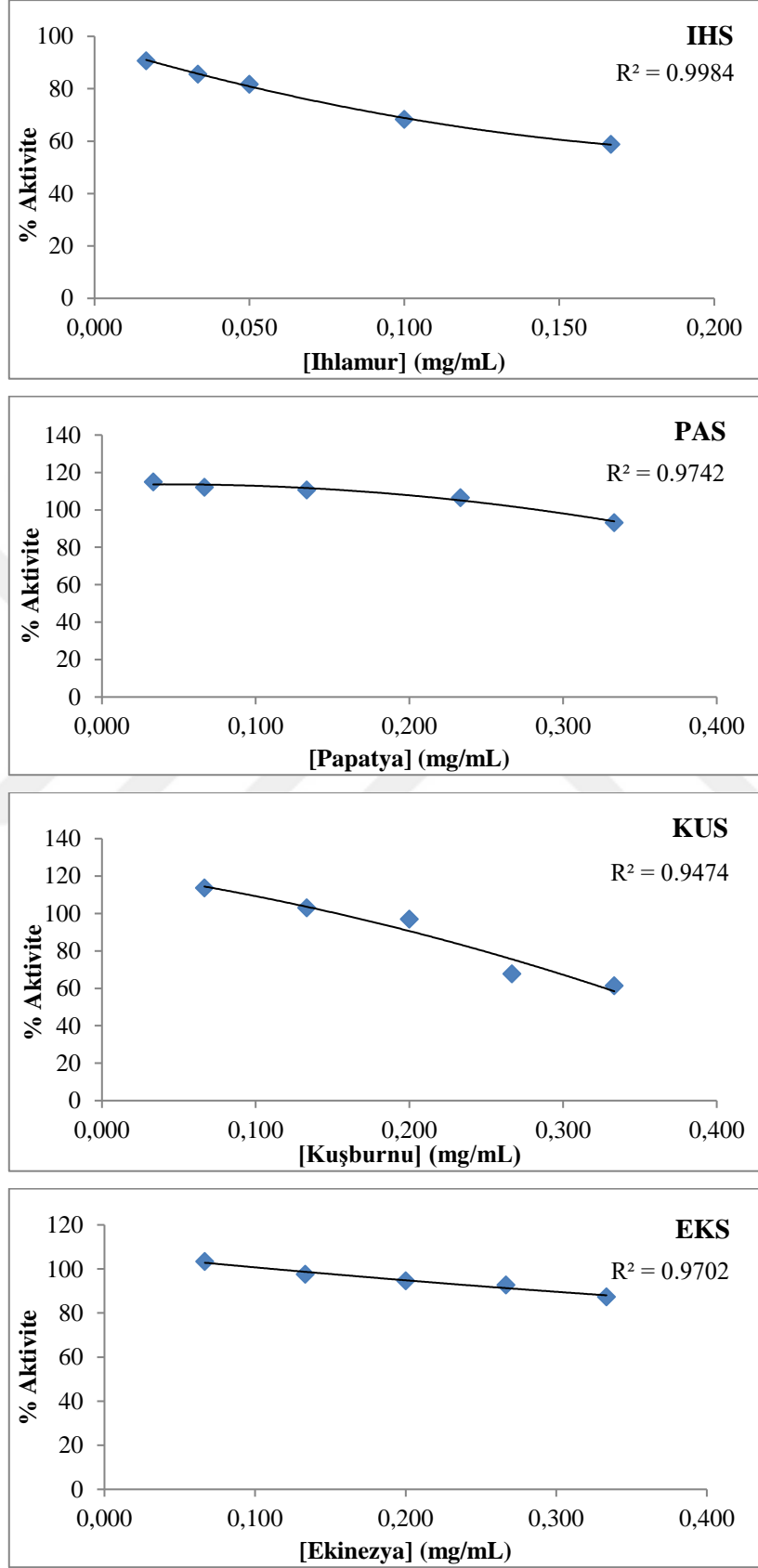
hCAII izoenzimi üzerine inhibisyon etkisine sahip olan her bir bitkisel çay ekstraktı için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi (Şekil 111). Çizilen grafiklerden % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) (Şekil 112) ve % inhibisyon (Şekil 113) değerleri hesaplandı. % İnhibisyon değerleri çay ekstraktlarının 2 mg/mL (son konsantrasyon 0.067 mg/mL)' de göstermiş oldukları inhibisyon değerleri kullanılarak verilmiştir. Aynı zamanda bu değerler diğer çay ekstraktları içinde sırasıyla Şekil 114, Şekil 115 ve Şekil 116'da verilmiştir.

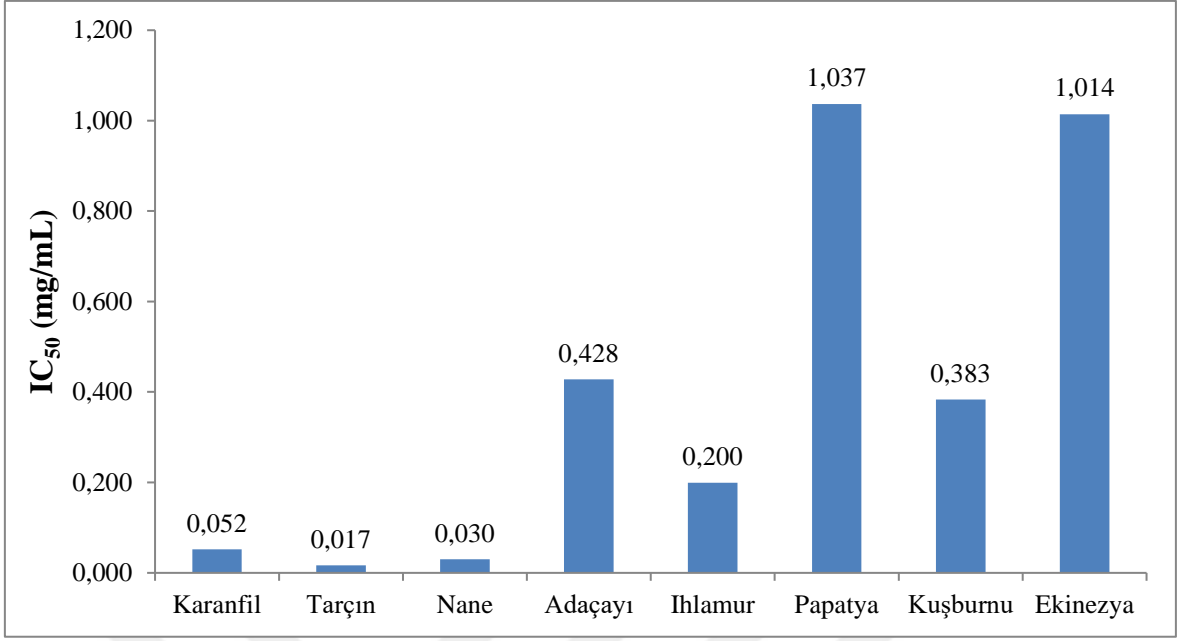




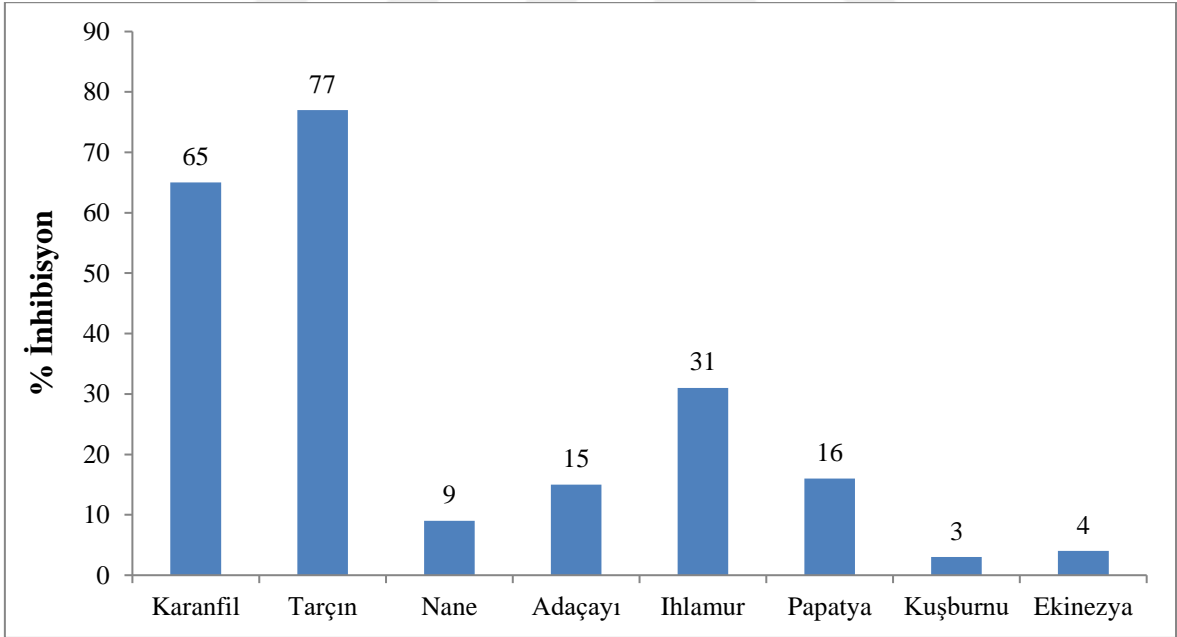
Şekil 111. hCAII enziminin esterase aktivite üzerine çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC_{50} değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikler

Şekil 111'in devamı

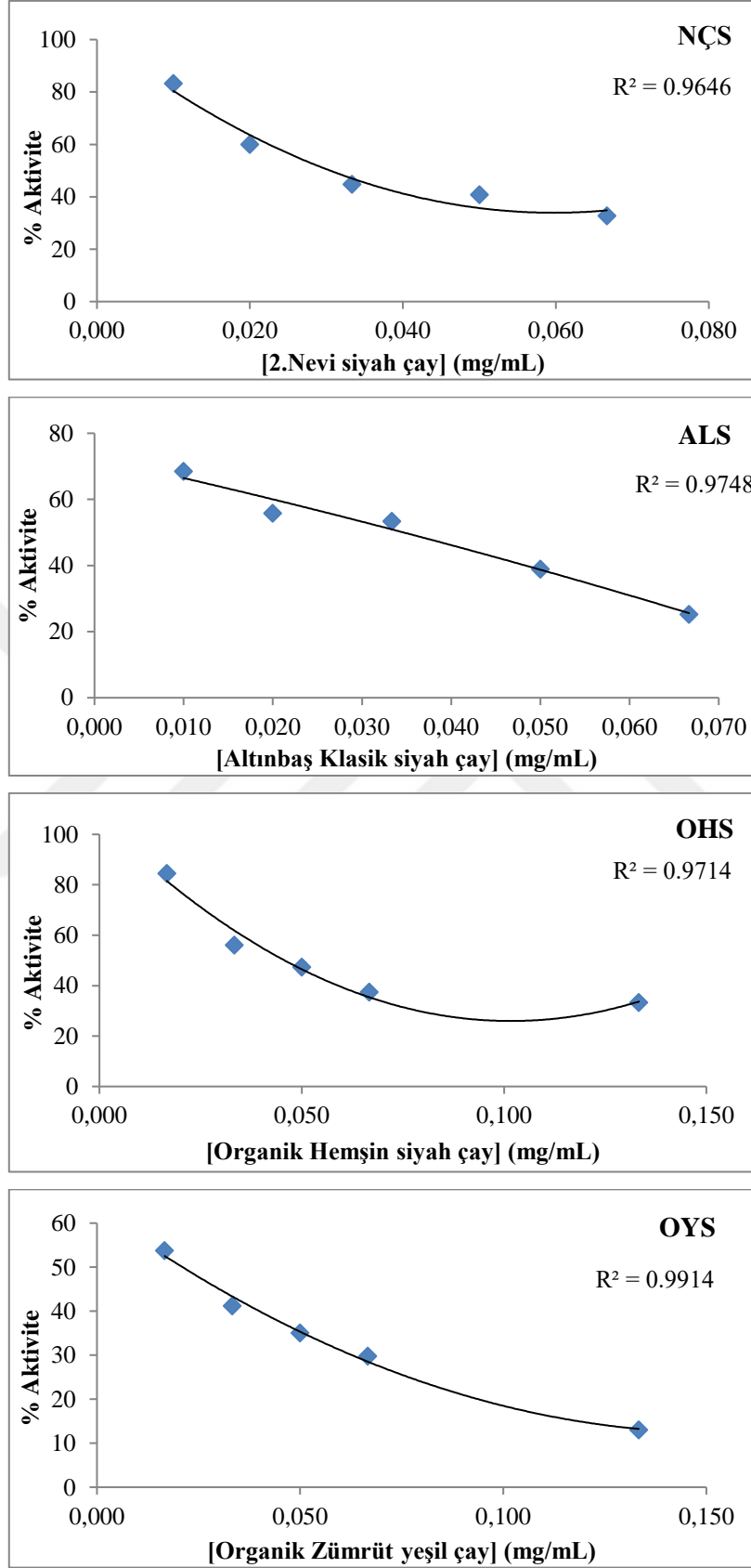




Şekil 112. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının IC₅₀ (mg/mL) değerleri

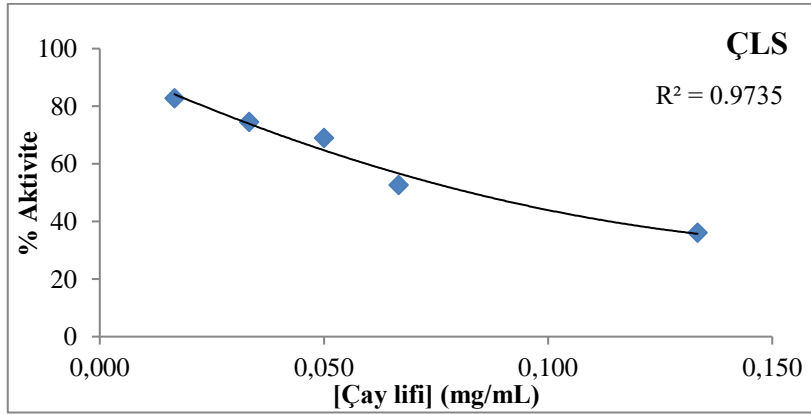
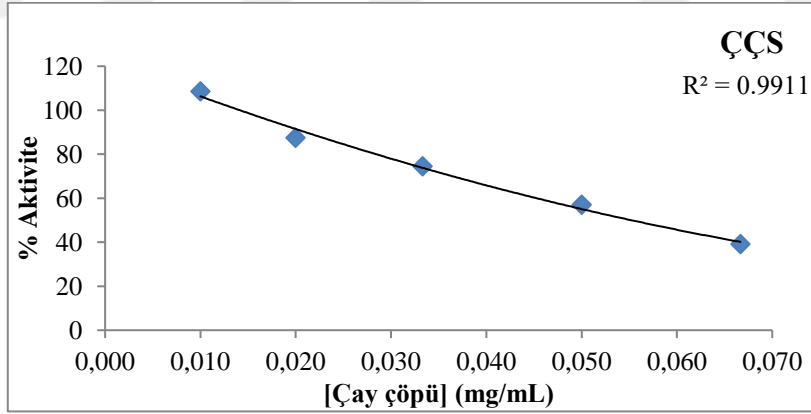
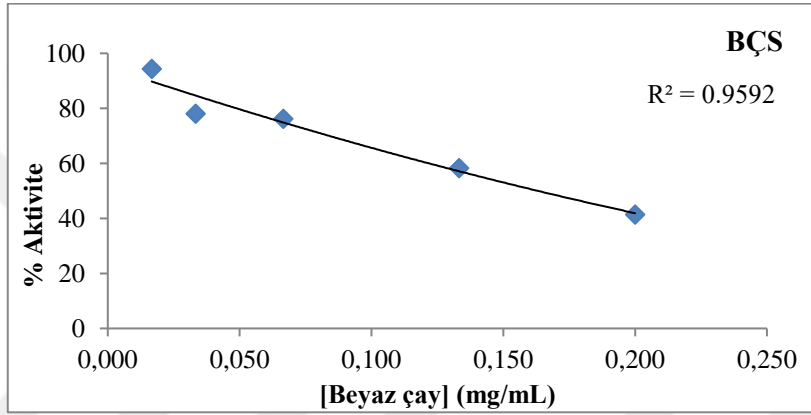
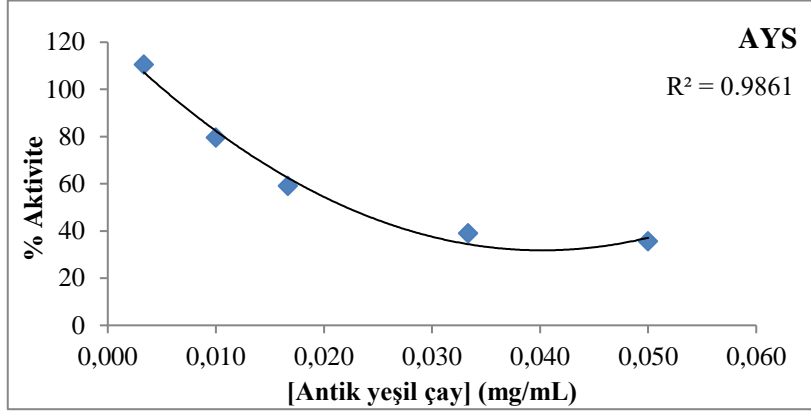


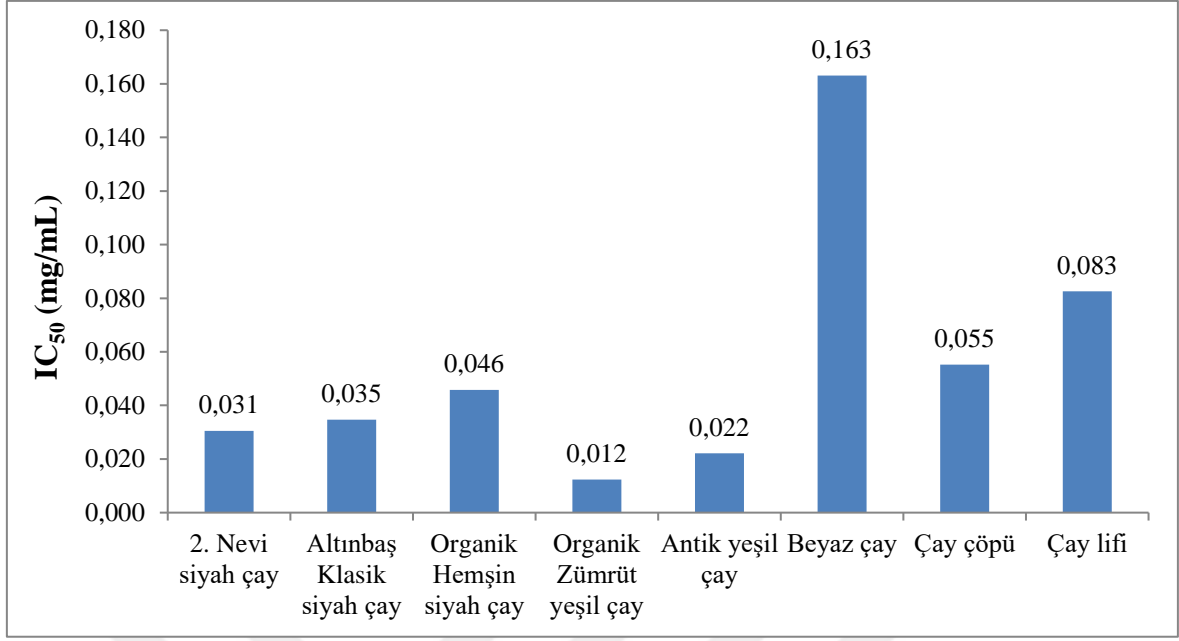
Şekil 113. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri



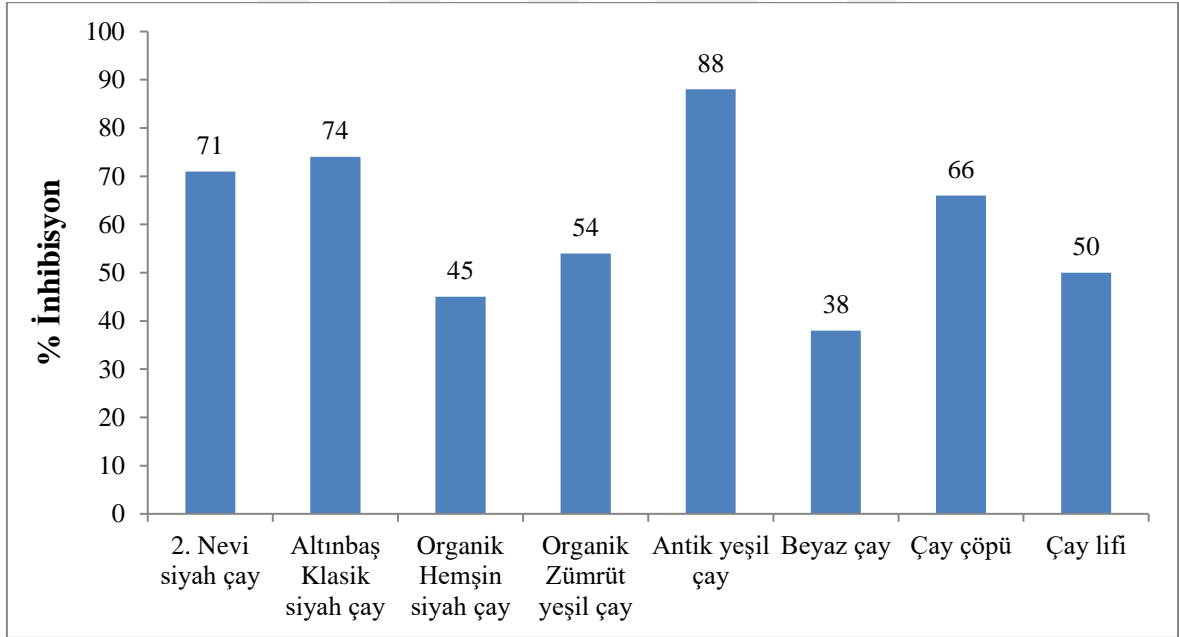
Şekil 114. hCAII enziminin esterez aktivite üzerine çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC₅₀ değerinin bulunması için 5 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-[I] grafikleri

Şekil 114'ün devamı





Şekil 115. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının IC₅₀ (mg/mL) değerleri



Şekil 116. hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan diğer çay ekstraktlarının 2 mg/mL (0.067 mg/mL son konsantrasyon)'deki % inhibisyon değerleri

Tablo 44. BCA, hCAI ve hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan gıda katkılarının IC₅₀ (µM) değerleri

Bileşik Adı	BCA (IC₅₀)	hCAI (IC₅₀)	hCAII (IC₅₀)
Eritrosin B	11	19	5
Kurkumin	77	189	74
Brilliant Blue FCF	136	208	364
İndigo karmin	142	1019	281
Brilliant Black BN	153	91	502
Ponceau 4R	240	678	617
Patent Blue V	267	474	397
Amarant	296	496	603
Karminik asit	587	684	581
Tartrazin	659	652	622
Sunset Yellow FCF	681	350	489
Allura Red AC	762	782	504
Butil hidroksi toluen (BHT)	513	463	104
Askorbik asit	994	1834	2160
Sorbik asit	1801	4566	3475
Benzoik Asit	1851	2784	2989
Sitrik asit	617	1799	1239
Asesülfam K	2350	5998	2872
Sakkarin	inaktif	2049	1015
Aspartam	inaktif	2817	2936
Rozmarinik asit	106	94	83

Tablo 45. BCA, hCAI ve hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan bitkisel çayların IC₅₀ (mg/mL) değerleri

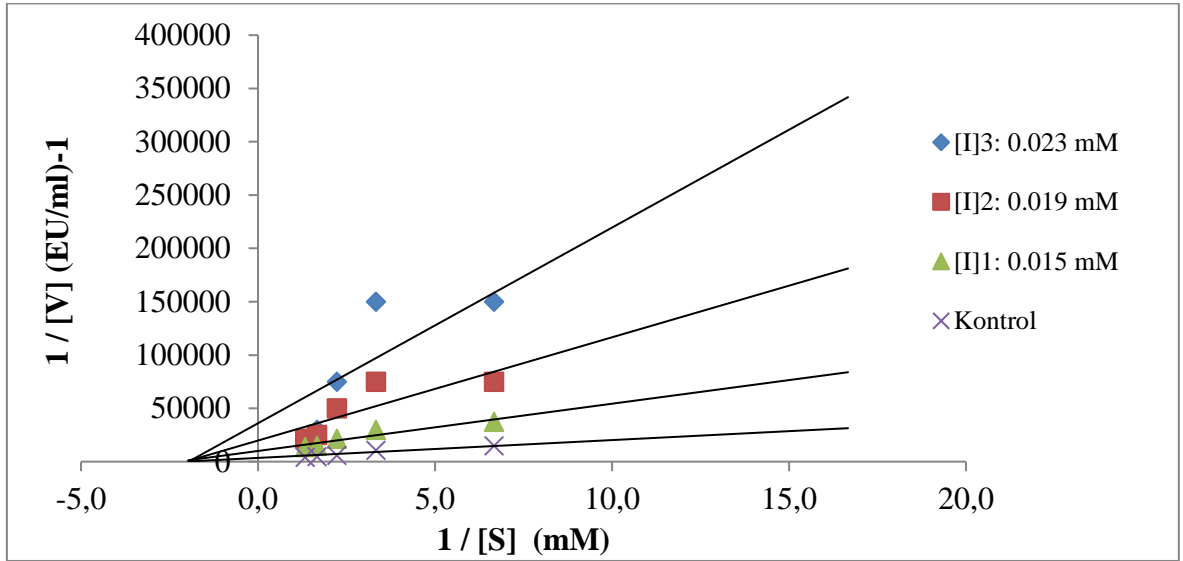
Bileşik Adı	BCA (IC ₅₀)	hCAI (IC ₅₀)	hCAII (IC ₅₀)
Karanfil	0,005	0,076	0,052
Tarçın	0,008	0,097	0,017
Nane	0,152	0,056	0,030
Adaçayı	0,162	0,226	0,428
Ihlamur	0,217	0,254	0,200
Papatya	0,504	0,192	1,037
Kuşburnu	0,702	0,671	0,383
Ekinezya	0,921	0,447	1,014

Tablo 46. BCA, hCAI ve hCAII esteraz aktivite yöntemi ile çalışılan *C. sinensis* çayların IC₅₀ (mg/mL) değerleri

Bileşik Adı	BCA (IC ₅₀)	hCAI (IC ₅₀)	hCAII (IC ₅₀)
Organik Yeşil çay	0,012	0,192	0,012
Çay çözü	0,024	0,413	0,055
Altınbaş Siyah çay	0,038	0,548	0,035
Nevi Siyah çay	0,039	0,282	0,031
Beyaz çay	0,046	0,229	0,163
Organik Hemşin Siyah çay	0,047	0,354	0,046
Çay lifi	0,049	0,472	0,083
Antik Yeşil çay	0,062	0,107	0,022

3.7. Eritrosin B İçin Ki Çalışma Sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCAI izoenzimi için Eritrosin B'nin, saflaştırılan hCAI izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren Eritrosin B için Ki grafikleri çizildi (Şekil 117). Ve çizilen grafikten Ki değerleri hesaplandı (Tablo 44).



Şekil 117. hCAI izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Eritrosin B konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 47. hCAI izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Eritrosin B'nin K_i değeri ve inhibisyon türü

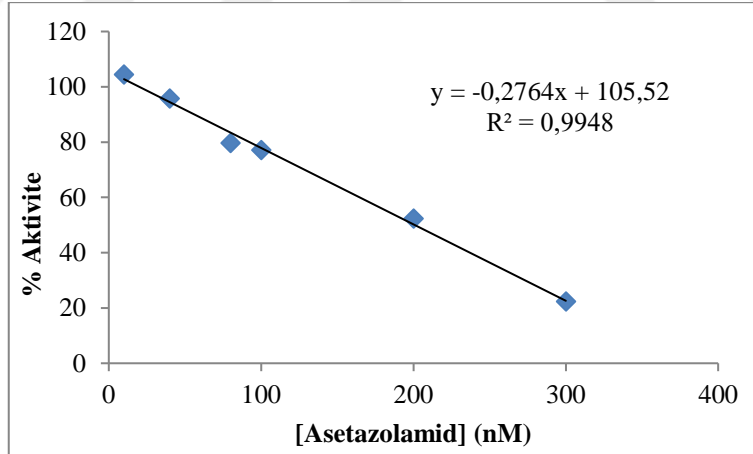
İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	[I] (mM)	Hesaplanan Ki değerleri	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon türü
Eritrosin B	0,019	0,015	0,0029	0,0028 ± 0,0011	Yarışmasız
		0,019	0,0017		
		0,023	0,0039		

3.8. Asetazolamid ve Sülfanilamid Standart İnhibitörlerin BCA Enzimi Üzerine Etkisi

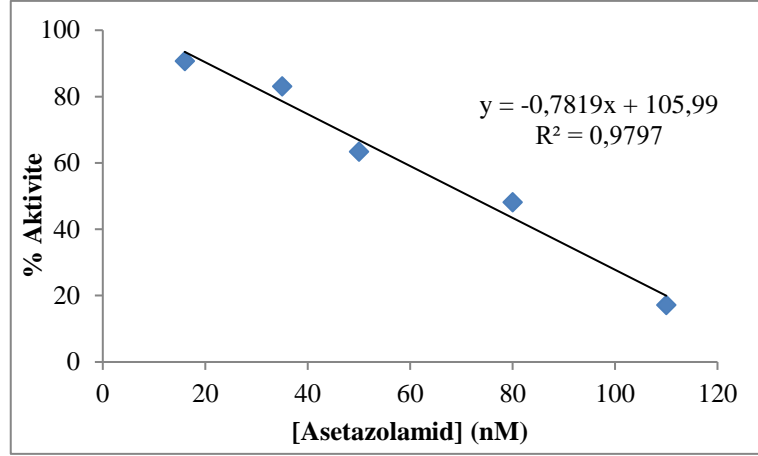
3 mM doygun substrat konsantrasyonunda, CA'nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin sığır eritrosit BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Ölçümler esteraz ve hidrataz aktivite tayin metoduyla yapılmıştır.

Asetazolamidin BCA enziminin esteraz aktivitesi ve hidrataz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri sırasıyla Şekil 118 ve 119'de verilmiştir. Sülfanilamidin BCA enziminin esteraz aktivitesi ve hidrataz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri sırasıyla Şekil 120 ve 121'de verilmiştir. Bu grafiklerden % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplanmıştır.

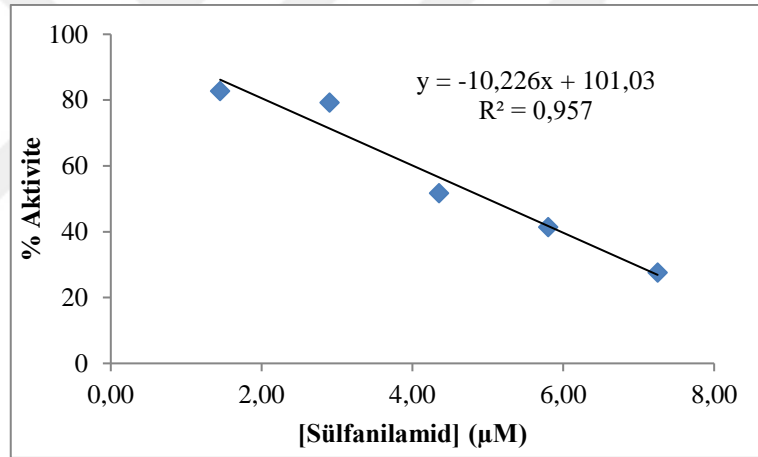
Asetazolamid için esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen IC_{50} değeri 200 nM, hidrataz aktivite yöntemi ile belirlenen IC_{50} değeri ise 72 nM olarak bulunmuştur. Sülfanilamid inhibitörü için esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen IC_{50} değeri 5 μ M, hidrataz aktivite yöntemi ile belirlenen IC_{50} değeri ise 5 μ M olarak bulunmuştur.



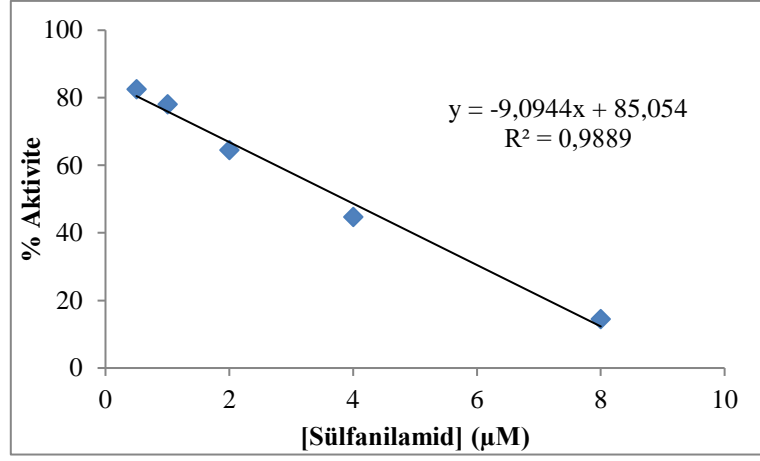
Şekil 118. BCA enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan asetazolamidin IC_{50} değerinin bulunması için 6 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri



Şekil 119. BCA enziminin hidrataz aktivite üzerine çalışılan asetazolamidin IC_{50} değerinin bulunması için 6 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri



Şekil 120. BCA enziminin esteraz aktivite üzerine çalışılan sülfanilamidin IC_{50} değerinin bulunması için 6 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri



Şekil 121. BCA enziminin hidrataz aktivite üzerine çalışılan sülfanilamidin IC₅₀ değerinin bulunması için 6 farklı konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafikleri

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidrolizaz E. C. 4. 2. 1. 1) aktif bölgesinde çinko (Zn^{+2}) iyonu içeren, eritrositlerde dahil olmak üzere çoğu hücre tipinde pH düzenleyici enzim olarak görev alan bir metaloenzimdir (Supuran vd. , 2003). Canlılarda CO_2 ve HCO_3^- arasındaki karşılıklı dönüşümü gerçekleştirir. Memelilerin farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş, 16 farklı (CAI-XIV) CA izoenzimi tespit edilmiştir (Supuran, 2010). CAI izoenzimi sitozolik olup, insan eritrositlerinde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. Ayrıca lenste, ter bezlerinde, kornea epitelyumunda, kalın bağırsağın epitelyumunda, adipoz dokuda bulunur. CAII izoenzimi diğer izoenzimlerle kıyaslandığında katalitik aktivitesi oldukça yüksek olup özellikle göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda yaygın olarak bulunmaktadır ve dönüşümsüz körlüğe sebep olan glokomda aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında bu enzimin inhibisyonu büyük rol oynamaktadır (Renzi vd., 2000).

Bilim adamları tarafından karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon ve aktivasyon etkisi gösteren birçok ilaç ve kimyasal maddeler araştırılarak etkileri literatürde rapor edilmiştir (Supuran ve Scozzafava, 2001; Beydemir ve Gülçin, 2004). Bazı ilaçlar için bu enzim birçok dokuda hedef molekül olarak kabul edilmektedir. Asetazolamid başta olmak üzere heteroaromatik sülfonamidler karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörleri olup CAI' lerinin ana sınıfını oluşturmaktadır ve klinikte başta glokom tedavisi olmak üzere anti-kanser, anti-tümör, anti-obezite, anti-epileptik ve nörolojik rahatsızlıklarda, pozitron emisyon tomografisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde, diagnostikte his materyali, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde halen yol gösterici olarak kullanılmaktadır (Bülbül vd, 2003; Supuran, 2008). Bu yüzden son yıllarda CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni inhibitör bileşiklerin literatüre kazandırılması çok büyük önem kazanmıştır (Supuran, 2008). Bu sayede, doğal ya da sentetik yeni CA inhibitörlerinin belirlenmesi ilaç potansiyeli yüksek olan bileşiklerin keşfi için önemli olacaktır.

Bu çalışmada, sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA) ve insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (hCAI ve hCAII), Sepharose 4B'nin serbest hidroksil gruplarının siyanojen bromür (CNBr) ile aktive edilmesinden sonra tirozinin kovalent olarak takılması ve son olarak sülfanilamidin diazolanarak kenetlenmesi ile hazırlanan kolonun

kullanılması sonucu saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimlerden tampon bileşenlerinin uzaklaştırılması için diyaliz işlemi uygulanmıştır. Daha sonra değişik protein çözeltileri elde etmek için dondurup kurutma yöntemi olan liyofilize işlemi yapılmıştır. Saflaştırılan izoenzimlerin saflıklarının kontrolü için SDS-PAGE uygulanarak her bir enzim için tek bant gözlenmiştir. Saflaştırılma sırasında eluatların protein miktarları hem kalitatif, hem de yarı kantitatif olarak belirlenmiştir. Kalitatif olarak 280 nm de herbir eluatın absorbansı ölçüldü. Yarı kantitatif protein tayinleri ise Coomassie-Blue yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemin diğer protein tayinlerine göre bozucu faktörlerin pek olmaması, çok kısa sürede uygulanabiliyor olması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalması gibi üstünlüklerinin yanı sıra yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Bu çalışmada karbonik anhidraz enzim aktivite tayin yöntemlerinden esteraz aktivitesi kullanılmıştır. Bu yöntemin esası karbonik anhidrazın ester bağlarını parçalanmasına dayanmaktadır (Armstrong vd., 1966). Karbonik anhidraz enzimi *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenole hidroliz etmesi sonucu oluşan ürün 348 nm'de absorpsiyona sahiptir. Bu yöntem Wilbur-Anderson yöntemine göre daha hassastır.

Bitkisel çaylarda ve *Camellia sinensis* çaylarında esas olarak fenolik asitler ve flavanoller olmak üzere bileşiklerin tanımlanması ve miktarlarının tayin edilmesi için geliştirilen HPLC-DAD-UV yöntemi kullanıldı. Yöntemde kullanılan DAD ile fenolik bileşikler 190-800 nm arasındaki absorbansa dayalı olarak izlenerek her bir standardın spektrumu kaydedildi. Ayrıca ve *C. sinensis* çaylarında ISO-14502-2 yöntemi kullanılarak HLPC-DAD ile 278 nm'de gallik asit, kafein ve kateşinlerin analizi yapıldı.

Çaylardaki çay kateşinleri, fenolik asitler ve kafein bileşimleri, çayın hasat mevsimine, türüne, bahçe koşullarına ve özellikle imalat işlemi sırasında fermantasyon derecelerine göre değişmektedir. Bu nedenle, yüksek kaliteli çay ürünlerinin geliştirilmesinde çay örneklerinde bu bileşiklerin seviyelerinin eş zamanlı olarak saptanması için basit ve güvenilir bir analitik yöntem oluşturmak önemlidir.

Çalışmada ıhlamur çayında HPLC-DAD ile fenolik bileşen analiz sonucunda tespit edilen fenolikler protokatekuik asit (177.2 mg/L ekstrakt), gallik asit (34.4 mg/L ekstrakt), *p*-OH benzoik asit (16.3 mg/L ekstrakt), kateşin (14.4 mg/L ekstrakt), vanilik asit (14.2 mg/L ekstrakt) ve ferulik asit (8.1 mg/L ekstrakt)'dir. Çalışmamızda içeriği aydınlatılan bitkiler literatürdeki çeşitli çalışmalardakilerle uyum içindedir. Farklı ıhlamur türlerindeki fenolik bileşikler incelenmiş ve major fenolik bileşenin protokatekuik asit olduğu tespit edilmiştir (Akyuz vd., 2014; Ieria vd., 2015). Tarçın çayının ana bileşenleri kateşin (64.7

mg/L ekstrakt), siringaldehit (29.2 mg/L ekstrakt) ve protokatekualdehit (3,4-dihidroksibenzaldehid) (18.3 mg/L ekstrakt)'dir. Literatürde de tarçında kateşin ve epikateşinin fazla miktarda bulunduğu bildirilmiştir (Vallverdú-queralt vd., 2014). Ayrıca yapılan çalışmalara göre ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan çözücü, tarçın ekstraktının kimyasal özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Genel olarak tarçında bulunan fenolik bileşikler gallik asit, vanilik asit, klorojenik asit, tannik asit, sinamik asit, şiringik asit, sinapik asit, kafeik asit, kumarik asit, *p*-OH benzoik asit, *p*-hidroksibenzaldehid ve ferulik asittir (Jiao vd., 2013; Li vd., 2013; Helal vd., 2014; Klejduš ve Kováčik, 2016). Adaçayının major bileşeninin rozmarinik asit olduğu tespit edildi (Tablo 19,13^a nolu bileşik). Böylece adaçayında rozmarinik asit, kafeik asit (111.3 mg/L ekstrakt) ve klorojenik asit (76.6 mg/L ekstrakt) bileşiklerinin varlığı gösterilmiştir. Kuşburnu çayında ise ana bileşen kateşin (1134.2 mg/L ekstrakt), protokatekuik asit (389.7 mg/L ekstrakt) ve gallik asit (98.5 mg/L ekstrakt)'dir. Ekinezya çayının bileşenleri kafeik asit (90.3 mg/L ekstrakt), protokatekuik asit (40.4 mg/L ekstrakt) ve klorojenik asit (20.3 mg/L ekstrakt)'dir. Papatya çayında da ekinezya çayında olduğu gibi klorojenik asit (535.8 mg/L ekstrakt), protokatekuik asit (196.1 mg/L ekstrakt) ve kafeik asit (58.4 mg/L ekstrakt) tespit edildi. Karanfil çayında oldukça yüksek konsantrasyonda gallik asit (2077.2 mg/L ekstrakt) tespit edildi. Nane çayının ana bileşeni adaçayında olduğu gibi rozmarinik asit olarak belirlendi. Aynı zamanda kafeik asit (146.0 mg/L ekstrakt), klorojenik asit (139.7 mg/L ve protokatekuik asit (126.7 mg/L ekstrakt) bileşiklerinin de varlığı gösterildi. Çalışılan üç siyah çay, iki yeşil çay, beyaz çay, çay çöpü ve çay lifi ekstraktlarında da HPLC-DAD ile fenolik bileşen analiz sonucunda tespit edilen ve standardı kullanılan tek fenolik asit gallik asittir.

Bu çalışmada 3 siyah çay, 2 yeşil çay, 1 beyaz çay, 1 çay lifi ve 1 çay çöpü ekstraktlarında ayrıca tek tek kateşinler, kafein ve gallik asidin eşzamanlı olarak ayrılması, tanımlanması ve miktar analizi HPLC-DAD metodu ile yapılmıştır. Buna göre en yüksek gallik asit miktarı siyah çaylarda (151.2-229.2 mg/L ekstrakt), en düşük miktar ise yeşil çaylarda (21.7-31.9 mg/L ekstrakt) tespit edildi. Fermantasyon süreci siyah çaylardaki gallik asit düzeylerini belirgin bir şekilde yükseltmektedir. Bunun yanı sıra hiçbir fermantasyona tabi olmadan doğrudan taze çay yapraklarının kurutulması ve buhara tabi tutulmasıyla elde edilen yeşil çay numuneleri ise daha yüksek seviyede epigallokateşin (1953.8-3033.7 mg/L ekstrakt), epigallokateşin gallat (1424.8-2015.6 mg/L ekstrakt), epikateşin (612.6-811.5 mg/L ekstrakt) ve epikateşin gallat (612.6-811.5 mg/L ekstrakt)

içermektedir (Tablo 43). Çayda en bol bulunan alkaloid olan kafein beyaz çay numunesinde en fazla miktarda tespit edildi (2179.2 mg/L ekstrakt). Çay lifi ve çay çöpü ekstraktlarında ise gallik asit miktarı (74.6-102.4 mg/L ekstrakt) yeşil çaylara göre daha fazla olup içerdiği kateşinler 41-180 mg/L ve kafein miktarları ise 697-923 mg/L arasında değişmektedir (Tablo 43).

Yirmi farklı gıda katkı maddesinin (12 tane renklendirici, 2 tane antioksidan, 3 tane tatlandırıcı, 2 tane koruyucu ve 1 tane asitlik düzenleyici) BCA esteraz aktivite yöntemi ile belirlenen IC_{50} değerleri 11-2350 μ M aralığındadır. Çalışılan gıda katkı maddelerine grup olarak bakıldığında en yüksek inhibisyon değerleri renklendiricilerde olup bunlar arasında en yüksek inhibisyon sentetik renklendirici olan Eritrosin B (IC_{50} : 11 μ M)'de tespit edildi. Eritrosin B 11 μ M'lık IC_{50} değeri ile CA'nın en güçlü inhibitörleri arasında olan sülfanilamide yakın bir IC_{50} değerine sahiptir. Bu sonuca göre sülfanilamid türevleri gibi bir oksiksanthen ve benzoik asit türevi olan Eritrosin B'nin türevleride CA inhibitörleri olarak çalışılmalıdır. Gıda katkı maddelerinin BCA esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi çalışmaları ilk defa bu çalışmada yapılmıştır. Hemen hemen her türlü yiyecek ve içeceğe antioksidan olarak katılan BHT (IC_{50} : 513 μ M) ve askorbik asitin (IC_{50} : 994 μ M) CA aktivitesi üzerine etkisi bulunmaktadır. Tatlandırıcılar olarak çalışılan sakkarin ve aspartamın BCA aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmayıp inaktif bulunmuştur. Asesülfam K ise en düşük inhibisyona (2 mg/mL konsantrasyonda % 13) sahiptir. Gıdalara koruyucu olarak katılan sorbik ve benzoik asitinde CA aktivitesi üzerine etkisi çok düşük tespit edildi. Son olarak gıdaların işlenmesinde asit düzenleyici olarak kullanılan sitrik asitin IC_{50} değeri 617 μ M olarak bulunmuştur.

Literatürde bazı gıda katkı maddelerinin hCAI ve hCAII üzerine etkisi çalışmaları yeni yapılmaktadır. Esmaili ve arkadaşları *in vitro* olarak farklı spektrofotometrik teknikler kullanarak renklendiriciler arasından Allura Red AC ile hCAII arasındaki etkileşimi çalışmıştır. Çalışmadan elde edilen IC_{50} değeri 565 μ M olup bulduğumuz sonuçlara benzemektedir. Ayrıca Şentürk ve arkadaşlarının doğal renklendiricilerden kurkumin ($IC_{50(hCAD)}$: 5.63 μ M ve $IC_{50(hCAD)}$: 4.81 μ M) ile çalışması bulunmaktadır.

Gıda katkı maddelerinin hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerine etkisine bakıldığında yine renklendiricilerin daha yüksek inhibisyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Her üç enzim içinde en yüksek inhibisyona sahip olan Eritrosin B'nin saflaştırılan hCAI izoenzimi için K_i değeri 0.0028 mM olup inhibisyon türü yarışmasız inhibisyon olarak bulundu. BCA enzimi üzerine etkisi çok az olan ya da bulunmayan tatlandırıcıların hCAI ve hCAII

izoenzimlerinin aktiviteleri üzerinde düşük te olsa etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Sakkarin $IC_{50(hCAI)}$: 2049 μ M ve Aspartam $IC_{50(hCAD)}$: 2817 μ M; Sakkarin $IC_{50(hCAII)}$: 1015 μ M ve Aspartam $IC_{50(hCAII)}$: 2936 μ M).

Çalışmamızda ayrıca bitkisel çaylar ve *C. sinensis* çay türlerinin de BCA, hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerine etkisi araştırıldı. Çalışma sonuçlarına göre bitkisel çaylar arasında BCA aktivitesi üzerine karanfil (IC_{50} : 0.005 mg/mL), tarçın (IC_{50} : 0.008 mg/mL) ve nane (IC_{50} : 0.152 mg/mL) çaylarının yüksek etkili olduğu, ekinezya çayının ise (IC_{50} : 0.921 mg/mL) düşük etki gösterdiği tespit edilmiştir. hCAI izoenzimi için yine nane (IC_{50} : 0.056 mg/mL), karanfil (IC_{50} : 0.076 mg/mL) ve tarçın (IC_{50} : 0.097 mg/mL) yüksek etki göstermiş olup kuşburnu (IC_{50} : 0.671 mg/mL) çayının düşük etki gösterdiği tespit edilmiştir. hCAII izoenzimi için de tarçın (IC_{50} : 0.017 mg/mL), nane (IC_{50} : 0.030 mg/mL) ve karanfil (IC_{50} : 0.052 mg/mL) çaylarında yüksek aktivite, ekinezya (IC_{50} : 1.014 mg/mL) çayında düşük aktivite bulunmuştur.

Bu çalışmada 14 fenolik bileşiğin BCA esteraz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Bu fenolik bileşiklerden 13 tanesinin sahip olduğu IC_{50} değeri 53-1940 μ M arasında olup siringik asitte ise aktivite görülmedi. Fenolik bileşiklerde hidroksisünamik asit türevlerinin BCA'yı daha iyi inhibe ettiği tespit edildi. Ayrıca HPLC-DAD ile yapılan fenolik bileşen analizinde adaçayı ve nanede major bileşen olan rozmarinik asitin de her üç enzim üzerinde inhibisyona ($IC_{50(BCA)}$: 106 μ M; $IC_{50(hCAI)}$: 94 μ M; $IC_{50(hCAII)}$: 83 μ M) sahip olduğu bulundu.

C. sinensis çay türlerinin BCA enziminin aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında en yüksek etkiyi IC_{50} değeri 0.012 mg/mL'olan Organik Zümrüt yeşil çay, en düşük etkiyi de Antik yeşil çay (IC_{50} : 0.062 mg/mL) göstermektedir. Çay çöpü ekstraktı ise diğer siyah, beyaz, yeşil çay ve çay lifinden daha düşük IC_{50} değerine, dolayısıyla da daha yüksek aktiviteye sahiptir.

C. sinensis çay türlerinin hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi en fazla Antik yeşil çay ($IC_{50(hCAD)}$: 0.107 mg/mL; $IC_{50(hCAII)}$: 0.022 mg/mL) ve Organik Zümrüt yeşil çayda ($IC_{50(hCAD)}$: 0.192 mg/mL; $IC_{50(hCAII)}$: 0.012 mg/mL) iken, en düşük etki Altınbaş Klasik siyah çay ($IC_{50(hCAI)}$: 0.548 mg/mL) ve beyaz çayda ($IC_{50(hCAII)}$: 0.163 mg/mL) gözlemlendi.

Seçicilik faktörü (Sf), bir numunenin inhibisyon etkisi açısından iki izoenzim arasında ortaya koyduğu ayırımın bir göstergesi olup, iki izoenzimle elde edilen IC_{50} değerlerinin oranı şeklinde hesaplanır. Sf'nin 1'den büyük olması IC_{50} 'si paydaya yazılan

izoenzim üzerine etkinin daha fazla olduğu anlamına gelir. Bu açıdan gıda katkı maddelerinin izoenzimler açısından Sf değerlerine bakıldığında (Tablo 48), Eritrosin B, İndigo karmin ve Butil hidroksi toluen (BHT)'nin hCAII üzerine seçici inhibitör olarak değerlendirilebilir. Aynı şekilde Tablo 49'a bakıldığında Tarçın çayı hCAII'nin seçici inhibitörü iken, papatya çayı hCAI'in seçici inhibitörü olabilir. Tablo 50'de *C. sinensis* çaylarda hCAII üzerine etki belirgin şekilde daha yüksek olup seçici hCAII inhibitörleri arayışında değerlendirilebilir.

Tablo 48. Gıda katkı maddelerinin izoenzimler açısından seçicilik faktörleri (Sf)

Bileşik Adı	Sf (hCAI/hCAII)	Sf (BCA/hCAI)	Sf (BCA/hCAII)
Eritrosin B	3,8	0,6	2,2
Kurkumin	2,6	0,4	1,0
Brilliant Blue FCF	0,6	0,7	0,4
İndigo karmin	3,6	0,1	0,5
Brilliant Black BN	0,2	1,7	0,3
Ponceau 4R	1,1	0,4	0,4
Patent Blue V	1,2	0,6	0,7
Amarant	0,8	0,6	0,5
Karminik asit	1,2	0,9	1,0
Tartrazin	1,0	1,0	1,1
Sunset Yellow FCF	0,7	1,9	1,4
Allura Red AC	1,6	1,0	1,5
Butil hidroksi toluen (BHT)	4,5	1,1	4,9
Askorbik asit	0,8	0,5	0,5
Sorbik asit	1,3	0,4	0,5
Benzoik Asit	0,9	0,7	0,6
Sitrik asit	1,5	0,3	0,5
Asesülfam K	2,1	0,4	0,8
Sakkarin	2,0	-	-
Aspartam	1,0	-	-
Rozmarinik asit	1,1	1,1	1,3

Tablo 49. Bitkisel çay ekstraktlarının izoenzimler açısından seçicilik faktörleri (Sf)

Numune Adı	Sf (hCAI/hCAII)	Sf (BCA/hCAI)	Sf (BCA/hCAII)
Karanfil	1,5	0,1	0,1
Tarçın	5,7	0,1	0,5
Nane	1,9	2,7	5,1
Adaçayı	0,5	0,7	0,4
Ihlamur	1,3	0,9	1,1
Papatya	0,2	2,6	0,5
Kuşburnu	1,8	1,0	1,8
Ekinezya	0,4	2,1	0,9

Tablo 50. *C. sinensis* çay ekstraktlarının izoenzimler açısından seçicilik faktörleri (Sf)

Numune Adı	Sf (hCAI/hCAII)	Sf (BCA/hCAI)	Sf (BCA/hCAII)
Organik Yeşil çay	16,0	0,1	1,0
Çay çöpü	7,5	0,1	0,4
Altınbaş Siyah çay	15,7	0,1	1,1
Nevi Siyah çay	9,1	0,1	1,3
Beyaz çay	1,4	0,2	0,3
Organik Hemşin Siyah çay	7,7	0,1	1,0
Çay lifi	5,7	0,1	0,6
Antik Yeşil çay	4,9	0,6	2,8

5. ÖNERİLER

Bu çalışmada, elde edilen bilgiler gıda ve içecek olarak tüketilen ürünlerin bileşenleri olan moleküllerin iki önemli yönden önemini ortaya koymuştur. Bunlardan birincisi bütün insan hücrelerinde önemli bir fonksiyonu yerine getiren karbonik anhidrazın inhibisyonunun oluşturabileceği sorunlardır. İkincisi ise, çalışılan saf madde ve karışımlardan yola çıkarak klinik olarak önemli ilaç potansiyeli olan yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin üretilebilmesidir.

Çay (*C. sinensis*) ve diğer bitkisel çaylar yaygın olarak tüketilmektedir. Bu çaylardan elde edilmiş olan sulu ekstraktlarla yapılan çalışma, bileşenlerin karbonik anhidrazı önemli ölçüde inhibe edebildiğini göstermiştir. Bu enzimin inhibisyonu ise metabolizmanın temel ürünü olan karbondioksitin dokulardan taşınıp vücuttan atılması mekanizmasının yavaşlaması anlamına gelmektedir. Bu istenmeyen durumun ne derece önemli olduğuyla ilgili bilgi, çay bileşenlerinin emilim ve doku dağılımı çalışmaları ve *in vivo* çalışmalarla ortaya konmalıdır. Bu açıdan yine bu çalışmada incelenen gıda katkı maddeleri de önemlidir. Gıda katkı maddeleri hazır gıdalarda yaygın kullanılması nedeniyle aynı bakış açısıyla değerlendirilmelidir. Hatta son yıllarda hazır gıda tüketiminin artmasına paralel olarak görülme sıklığı artan hastalıkların karbonik anhidraz inhibisyonu ile ilişkisi ortaya konmalıdır.

Çalışılan bitkiler ve saf maddelerle elde edilen veriler, aynı zamanda yeni doğal ve sentetik karbonik anhidraz inhibitörleri konusunda yeni çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu anlamda özellikle gıda katkı maddeleri arasında enzim inhibisyonu standart inhibitörlere yakın olanlar iyi bir başlangıç noktası teşkil edecektir.

Gıda bileşenlerinin CA inhibisyonu üzerinden sağlık üzerine etkileri ve tespit edilen yüksek aktiviteli bileşiklerden başlayan yeni bileşiklerin sentezi konularında araştırma grubumuz tarafından yeni çalışmaların planlanması yapılmaktadır. Bitki bileşenlerinin karbonik anhidraz inhibisyonu ile ilgili çalışmalar ise halen sürdürülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C. and Shahidi, F., 2001. Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties, J. Agric. Food Chem., 49, 1410-1416.
- Alber, B. E. ve Ferry, J. G., 1994. A Carbonic Anhydrase From the Archaeon *Methanosarcina thermophila*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 6909-6913.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition, Garland Science, 2002.
- Alterio, V., Di Fiore, A. ve D'Ambrosio, K., 2012. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms?, Chem. Rev., 112, 4421-4468.
- Akbaba, Y., Balaydın, H.T., Menzek, A., Göksu, S., Şahin, E. ve Ekinci, D., 2013. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Bromophenol Derivatives as Carbonic Anhydrase Inhibitors, Arch. Pharm., 346, 447-454.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2013. Novel Sulfamides as Potential Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitors, Bioorg. Med. Chem., 21, 379- 385.
- Aksu, K., Nar, M., Tanç, M., Vullo, D., Gülçin, İ., Göksu, S., Tümer, F. ve Supuran, C. T., 2013. The Synthesis of Sulfamide Analogues of Dopamine Related Compounds and Their Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties, Bioorg. Med. Chem., 21, 2925-2931.
- Akyuz, E., Şahin, H., Islamoğlu, F., Kolaylı, S. ve Sandra, P., 2014. Evaluation of Phenolic Compounds in *Tilia rubra* Subsp. *caucasica* by HPLC-UV and HPLC-UV-MS/MS, International Journal of Food Properties, 17, 331–343.
- Annie, F. ve Jean-Jacques, M., 2003. Phenolic Acids in Fruits and Vegetables. Flavonoids in Health and Disease, 2nd edn. New York, USA: CRC Press.
- ArasHisar, Ş., Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. ve Yanık, T., 2004. Effect of Vitamin E on Carbonic Anhydrase Enzyme Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Erythrocytes in vitro and in vivo. Acta Vet. Hung. 52, 413-422.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. ve Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase, Journal of Biological Chemistry, 214, 5137-5149.

- Arts I.C., Van de Putte, B. ve Hollman, P.C., 2000. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods, J Agric Food Chem., 48, 1746-1751.
- Avula, B., Wang, Y. H., Wang, M., Avonto, C., Zhao, J., Smillie, T. J., Rua, D., Khan, I. A., 2014. Quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-UV-MS and use of partial least-square discriminant analysis to differentiate chemo-types of Chamomile/*Chrysanthemum* flower heads, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 88, 278-288.
- Bailey, R. G., Nursten, H. E., ve McDowell, I., 1990. Use of an HPLC photodiode-array detector in a study of the nature of a black tea liquor, Journal of the Science of Food and Agriculture, 52, 509– 525.
- Bahadori, M. B., Asghari, B., Dinparast, L., Zengin, G., Sarikurkcu, C., 2017. Abbas-Mohammadi, M., ve Bahadori, S., *Salvia nemorosa* L.: A novel source of bioactive agents with functional connections, Food Science and Technology, 75, 42-50.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S., 2006. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence and Potential Uses, Food Chemistry, 99, 191- 203.
- Balaydın, H. T., Durdağı, S., Ekinci, D., Şentürk, M., Göksu, S. ve Menzek, A., 2012. Inhibition of Human Carbonic Anhydrase Isozymes I, II and VI with a Series of Bisphenol, Methoxy and Bromophenol Compounds, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 27, 467-475.
- Balaydın, H. T., Şentürk, M., Göksu, S. ve Menzek, A., 2012. Synthesis and Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties of Novel Bromophenols and Their Derivatives Including Natural Products: Vidalol B., Eur. J. Med. Chem., 54, 423-428.
- Bavaresco, L., 2003. Role of Viticultural Factors on Stilbene Concentrations of Grapes and Wine. Drugs under Experimental and Clinical Research, 29, 181-187.
- Beydemir, Ş. ve Gülçin, İ., 2004. Effect of Melatonin on Carbonic Anhydrase from Human Erythrocyte in vitro and From Rat Erythrocyte in vivo. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 19, 193-197.
- Benayad, Z., Gómez-Cordovés, C., ve Es-Safi, N. E., 2014. Characterization of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) crude seeds by HPLC-DAD-ESI/MS analysis, International Journal of Molecular Sciences, 15, 20668–20685.
- Beydemir, Ş., Ciftci, M. ve Kufrevioğlu, O.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 25, 966-969.

- Bimakr, M., Abdul Rahman, R., Saleena Taip, F., Ganjloo, A., Md Salleh, L., Selamat, J., Hamid, A., ve Zaidul, I. S. M., 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L) leaves, Food and Bioproducts Processing, 89, 67-72.
- Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., vd., 1997. Carbonic Anhydrase Activators: X-ray Crystallographic and Spectroscopic Investigations Form the Interaction of Isozymes I and II with Histamine. Biochemistry, 36, 10384-10392.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutr. Rev., 56, 317-333.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-251.
- Brito, A., Ramirez, J. E., Areche, C., Sepúlveda, B., ve Simirgiotis, M. J., 2014. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile, Molecules, 19, 17400–17421.
- Bülbül M., Hisar, O., Beydemir, S., Ciftci, M. ve Kufrevioglu, O. I., 2003. The in vitro and in vivo Inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity, Journal of Enzyme Inhibition Medical Chemistry, 18, 371-375.
- Carta, F., Scozzafava, A. ve Supuran, C. T., 2012. Sulfonamides (RSO₂NH₂): a Patent Review 2008-2012. Expert Opin Ther Patents, 22, 747-758.
- Cazes, J., 2005. Ewing's Analytical Instrumentation Handbook (3.bs.). New York, U.S.A: Marcel Dekker.
- Çetinkaya, Y., Göçer, H., Göksu, S. ve Gülçin, İ., 2013. Synthesis and Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitory Effects of Novel Benzylamine Derivatives, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 29, 168-174.
- Clifford, M.N. 2000. Anthocyanins-Nature, Occurrence and Dietary Burden, J. Food Sci. Agric., 80, 1063-1072.
- Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. ve Ekinçi, D., 2007. Morphine Inhibits Erythrocyte Carbonic Anhydrase in vitro and in vivo. Biol. Pharm. Bull. 30, 2257-2261.
- Cortés-Rojas, D. F., Fernandes de Souza, C. R., ve Oliveira, W. P., 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4, 2, 90-96.
- Coward, L., Smith, M., Kirk, M. ve Barnes, S., 1998. Chemical Modification of Isoflavones in Soyfoods During Cooking and Processing, Am. J. Clin. Nutr., 68, 1486-1491

- Cox, E. H., McLendon, G. L., Morel, F. M. vd., 2000. The Active Site Structure of *Thalassiosira weissflogii* Carbonic Anhydrase 1, Biochemistry, 39, 12128-12130.
- Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Stanoeva, J. P., Karapandzova, M., Stefova, M. ve Kulevanova, S., 2013. Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe, Journal of Chromatography A, 1282, 38–45.
- Da Silva Pinto, M., 2013. Tea: A new perspective on health benefits, Food Research International, 53, 2, 558–567.
- Davis, R. A., Vullo, D., Maresca, A., Supuran, C. T. ve Poulsen, S.A., 2013. Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21, 6, 1539–43.
- Del Prete, S., Vullo, D., Fisher, G. M., vd., 2014. Discovery of a New Family of Carbonic Anhydrases in the Malaria Pathogen *Plasmodium falciparum* - The η - Carbonic Anhydrases, Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 24, 4389-4396.
- Demir, A., Farklı Kuşburnu (*Rosa* sp.) Türlerinde Olgunlaşma Süresince Fenolik Bileşik Değişimi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 2012.
- Devlin, T. M., 2002. Biochemistry with Clinical Correlations, Kanada.
- Dorman, H. J. D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., ve Hiltunen, R., 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4563-4569.
- Elleuche, S. ve Pöggeler, S., 2010. Carbonic Anhydrases in Fungi, Microbiology, 156, 23-29.
- Es-Safi, N.E, Cheynier, V. ve Moutounet, M., 2002. Interactions Between Cyanidin 3-*O*-Glucoside and Furfural Derivatives and Their Impact on Food Color Changes, J. Agric. Food Chem., 50, 5586-5595.
- Esmaili, S., Ashrafi-kooshk, M. R., Khaledian, K., ve Adibi, H., 2016. Degradation products of the artificial azo dye , Allura red , inhibit esterase activity of carbonic anhydrase II : A basic in vitro study on the food safety of the colorant in terms of enzyme inhibition, Food Chemistry, 213, 494–504.
- Feng, Y., McDonald, C.E. ve Vick, B.A., 1988. C-Glycosylflavones From Hard Red Spring Wheat Bran, Cereal Chem., 65, 452-456.
- Fabrizi, F., Mincione, F., Somma, T., vd., 2012. A New Approach to Antiglaucoma Drugs: Carbonic Anhydrase Inhibitors with or without NO Donating Moieties.

Mechanism of Action and Preliminary Pharmacology, J Enzyme Inhib Med Chem, 27, 138-147.

- Fang, X., Wang, J., Hao, J., Li, X., ve Guo, N., 2015. Simultaneous extraction , identification and quantification of phenolic compounds in *Eclipta prostrata* using microwave-assisted extraction combined with HPLC – DAD – ESI – MS / MS, Food Chemistry, 188, 527–536.
- Feldstein, J.B. ve Silverman D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat, Journal of Biological Chemistry, 259, 5447-5453.
- García-Villalba, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., ve Rocha-Guzmán, N. E., 2017. Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas, Journal of Food Composition and Analysis, 63, 38–46.
- Göçer, H. ve Gülçin, İ., 2013. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): a Potent Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitor. Int. J. Acad. Res. 5, 150-155.
- Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Me' rillon, J. M. ve Ramawat, K.G., 2012. Secondary Metabolites and Plant Defence. In: *Plant Defence: Biological Control* (edited by J.M.M. Me' rillon & K.G.G. Ramawat). 109-138. Berlin: Springer.
- Hames, B.D., *Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach* Oxford University Pres, 1998.
- Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S.V. ve Peralta, R.M., 2012. International Journal of Food Science and Technology, 47, 2023-2044.
- Harborne, J. B. and Williams, C. A., 2000. Advances in Flavonoid Research since 1992, Phytochemistry, 55, 481-504.
- Hegarty, V.M., May, H. M. ve Khaw, K.T., 2000. Tea drinking and bone mineral density in older women, American Journal Of Clinical Nutrition, 71,4, 1003-1007.
- Helal, A., Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., ve Conte, A., 2014. Bioaccessibility of Polyphenols and Cinnamaldehyde in Cinnamon Beverages Subjected to in Vitro Gastro-Pancreatic Digestion, Journal of Functional Foods, 7, 506-516.
- Hewett-Emmett, D. ve Tashian, R.E., 1996. Functional Diversity, Conservation and Convergence in the Evolution of the α , β and γ -Carbonic Anhydrase Gene Families, Molecular Phylogenetics and Evolution, 5, 1, 50-77.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmı, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S. ve Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase, Biochemical Journal, 392, 83-92.

- Horžić, D., Komes, D., Belscak, A., Ganic, K.K., Ivekovic, D. ve Karlovic D., 2009. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions, Food Chemistry, 115, 441–448.
- Ieria, F., Innocenti, M., Possieric, L., Gallori, S., ve Mulinacci, N., 2015. Phenolic composition of “bud extracts” of *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L. and *Tilia tomentosa* M., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 115, 1–9.
- Ignat, I., Volf, I. ve Popa, V.I., 2011. A critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables, Food Chemistry, 126, 1821–1835.
- Innocenti, A., Gülçin, İ., Scozzafava, A. ve Supuran, C. T., 2010. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Antioxidant Polyphenol Natural Products Effectively Inhibit Mammalian Isoforms I-XV. Bioorg. Med. Chem. Lett. , 20, 5050-5053.
- Innocenti, A., Öztürk-Sarıkaya, S. B., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2010. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Mammalian Isoforms I-XIV with a Series of Natural Product Polyphenols and Phenolic Acids, Bioorg. Med. Chem. 18, 2159-2164.
- Inoue, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Shibutani, M., Takagi, H. ve Hirose, M., 2009. Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study, Food and Chemical Toxicology, 47,1, 184–191.
- Jabusch, J.R. ve Deutsch, H.F., 1989. Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat, Archives of Biochemistry and Biophysics, 238, 170-177.
- Jiao, L., Zhang, X., Huang, L., Gong, H., Cheng, B., Sun, Y., Li, Y., Liu, Q., Zheng, L., ve Huang, K., 2013. Proanthocyanidins are the Major Anti-Diabetic Components of Cinnamon Water Extract, Food and Chemical Toxicology, 56, 398-405.
- Kaiser, E.T. ve Lo, K.W., 1969. The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane, Journal of the American Chemical Society, 91, 4912.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*, 2012.
- Klejdus, B., ve Kováčik, J., 2016. Quantification of Phenols in Cinnamon: A Special Focus on “Total Phenols” and Phenolic Acids Including DESI-Orbitrap MS Detection, Industrial Crops and Products, 83, 774-780.
- Kocak, M. S., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, C. M., ve Tepe, B., 2016. *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity, Industrial Crops and Products, 85, 204–212.

- Kohler, K., Hillebrecht, A., Wischeler, J. S., Innocenti, A., Heine, A., Supuran, C. T. ve Klebe, G., 2007. Saccharin inhibits carbonic anhydrases: Possible explanation for its unpleasant metallic aftertaste, Angewandte Chemie-International Edition, 46, 40, 7697-7699.
- Koz, Ö., Ekinci, D., Perrone, A., Piacente, S., Alankuş-Çalışkan, Ö., Bedir, E. ve Supuran, C. T., 2013. Analysis of saponins and phenolic compounds as inhibitors of α -carbonic anhydrase isoenzymes, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 28, 2, 412-17.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. ve Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in plasmodium falciparum, International Journal of Parasitology, 31, 661-668.
- Kenkel, J., 1994. Analytical Chemistry for Technicians (2.bs.). Washington, D.C: Lewis Publishers.
- Kafalı, H., 2008. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kolon Sonrası Türevlendirme ile 7 Adet Sulfonamid Tespitinin Metot Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I. and Heinonen, M., 2001. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4076-4082.
- King, H.G.C., 1962. Phenolic Compounds of Commercial Wheat Germ. J. Food Sci., 27, 446-454.
- Klenkar, J., and Molnar, M., 2015. Natural and synthetic coumarins as potential anticancer agents, J. Chem. Pharmaceu. Res., 7, 1223-1238.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Lane, T. W. ve Morel, F. M., 2000. A Biological Function for Cadmium in Marine Diatoms, Proceedings of the National Academy of Sciences, 97, 4627-4631.
- Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B. ve Engelhardt, U. H., 2000. Flavonoids and Other Polyphenols in Consumer Brews of Tea and Other Caffeinated Beverages. J. Agric. Food Chem., 48, 2848-2852.
- Lehninger, A. L, Nelson, D. L. ve Michael, M. C., 2005. Principles of biochemistry, New York , W.H. Freeman.
- Li, B., Zhang, C., Peng, L., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y., ve Liu, Y., 2015. Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected Salvia species measured by GC-MS and HPLC methods, Industrial Crops and Products, 69, 329-334.

- Li, Y. Q., Kong, D.X., Huang, R.S., Liang, H. L., Xu, C.G., ve Wu, H., 2013. Variations in Essential Oil Yields and Compositions of Cinnamomum Cassia Leaves at Different Developmental Stages, Industrial Crops and Products, 47, 92-101.
- Liljas, A. and Laurberg, M., 2000. A Wheel Invented Three Times. The Molecular Structures of the Three Carbonic Anhydrases, EMBO Reports, 1, 1, 16-17.
- Lin, S., Zhu, Q., Wen, L., Yang, B., Jiang, G., Gao, H., ve Jiang, Y., 2014. Production of quercetin, kaempferol and their glycosidic derivatives from the aqueous-organic extracted residue of litchi pericarp with *Aspergillus awamori*, Food Chemistry, 145, 220–227.
- Liu, A. H., Lin, Y. H., Yang, M., Guo, H., Guan, S. H., Sun, J. H., ve Guo, D. A., 2007. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSn, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 846, 32–41.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P. ve Sharma, P.K., 2010. High Performance Liquid Chromatography: A Short Review, Journal of Global Pharma Technology, 2, 22-26.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. ve Jimenez, L., 2004. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, Am. J. Clin. Nutr., 79, 727-747.
- Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C. ve Godman, D.F., 1997. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor, The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics, 280, 98-104.
- Mazza G. ve Cotrell T., 1999. Volatile components of roots, stems, leaves and flowers of *Echinacea* species, Journal Agricultural and Food Chemistry, 47, 3081–3085.
- Middleton, E., Kandaswami, C. ve Theoharides, T. C., 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer, Pharmacol Rev., 52, 673-751.
- Naczki, M. and Shahidi, F., 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food. J. Chromatogr. A, 1054, 95-111.
- Nar, M., Çetinkaya, Y., Gülçin, İ. ve Menzek, A., 2013. (3,4-Dihydroxyphenyl)(2,3,4-trihydroxyphenyl)Methanone and Its Derivatives as Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitors, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 28, 402-406
- Nelson, D.L. ve Cox M.M., 2005. Lehninger biyokimyanın ilkeleri, Çeviren: N. Kılıç, 243-293, Palme Yayıncılık, Ankara.

- Nishimori, I., 2004. Acatalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins, in Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators, Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds., 24-43, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Official journal of the European Union. 'Regulation (EC) No:1333-2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives'. http://europa.eu/legislation_summaries/consumers/product_labelling_and_packaging/sa0003_en.htm Son erişim tarihi: 5 Mayıs 2015.
- Oniszczyk, T., Oniszczyk, A., Gondek, E., Guz, L., Puk, K., Kocira, A., Kusz, A., Kasprzak, K., ve Wojtowicz, A., 2016. Active polyphenolic compounds, nutrient contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.), Saudi Journal of Biological Sciences.
- Oztürk, S. B., Topal, F., Sentürk, M., Gülçin, I. ve Supuran, C. T., 2011. In vitro inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21, 14, 4259–62.
- Öztürk-Sarıkaya, S. B., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2010. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Human Erythrocyte Isozymes I and II with a Series of Phenolic Acids. Chem. Biol. Drug Des., 75, 515-520.
- Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y. ve Hirasawa, M., 1991. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Research, 25, 438–443.
- Papageorgiou, V., Mallouchos, A., ve Komaitis, M., 2008. Investigation of the antioxidant behavior of air- and freeze-dried aromatic plant materials in relation to their phenolic content and vegetative cycle, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 5743-5752.
- Parkkila, S., Vullo, D., Puccetti, L., Parkkila, A. K., Scozzafava, A. ve Supuran, C. S., 2006. Carbonic Anhydrase Activators: Activation of Isozyme XIII with Amino Acids and Amines. Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 3955-3959.
- Park, H., Song, B. ve Morel, F.M.M., 2007. Diversity of the Cadmium Containing Carbonic Anhydrase in Marine Diatoms and Natural Waters, Environmental Microbiology, 9, 403-413.
- Prasad, K. N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., ve Jiang, Y., 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 627-632.
- Price, S. F., Breen, P. J., Valladao, M. ve Watson, B. T. 1995. Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot Noir Grapes and Wine, Am. J. Enol. Vitic., 46, 187-194.

- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J. E., ve Komaitis, M., 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1190-1195.
- Ratnam, D. V., Bhardwaj, V., ve Kumar, M. N. V. R., 2006. Simultaneous analysis of ellagic acid and coenzyme Q 10 by derivative spectroscopy and HPLC, Talanta, 70, 387–391.
- Ren, X.L., ve Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1120, 81-86.
- Renzi, G., Scozzafava, A. ve Supuran, C.T., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors: topical sulfonamide antiglaucoma agents incorporating secondary amine moieties, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 10, 673-676.
- Robards, K. and Antolovich, M., 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids Review, Analyst, 122, 11-34.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. and Glover, W., 1999. Phenolic Compounds and Their Roles in Oxidative Process in Fruits, Food Chemistry, 66, 401-436.
- Roberts, S. B., Lane, T. W. ve Morel, F. M., 1997. Carbonic Anhydrase in the Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii* (*Bacillariophyceae*), Journal of Phycology, 33, 845- 850.
- Sahin, H., Can, Z., Yildiz, O., Kolayli, S., Innocenti, A., Scozzafava, G. ve Supuran, C. T., 2012. Inhibition of carbonic anhydrase isozymes I and II with natural products extracted from plants, mushrooms and honey, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 27, 3, 395–402.
- Sarikaya, S. B. O., Gülçin, I. ve Supuran, C. T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids, Chemical Biology & Drug Design, 75,5, 515–20.
- Sartelet, H., Serghat, S., Lobstein, A., et al., 1996. Flavonoids Extracted From Fonio Millet (*Digitaria exilis*) Reveal Potent Antithyroid Properties, Nutrition, 12, 100- 106.
- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations, Inc, New York, 403, 1968.
- Şentürk, M., Gülçin, i., Daştan, A., Küfrevioğlu, Ö. İ. ve Supuran, C. T., 2009. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Human Erythrocyte Isozymes I and II with a Series of Antioxidant Phenols. Bioorg. Med. Chem., 17, 3207-3211.
- Senturk, M., Gulcin, I., Beydemir, S., Kufrevioglu, O. I. ve Supuran, C. T., 2011. In Vitro Inhibition of Human Carbonic Anhydrase I and II Isozymes with Natural Phenolic Compounds, Chemical Biology & Drug Design, 77, 6, 494-499.

- Sethi, K. K., Sahoo, S. K., Pichikala, J. N. ve Suresh, P., 2012. Carbonic anhydrase I and II inhibition with natural products: caffeine and piperine, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 27,1, 97-100.
- Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., ve Srivastava, M. K., 2011. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview, Pharmacognosy Review, 5, 9, 82–95.
- Shi, Z., ve Chang, W., 2003. Simultaneous separation and determination of five bioactive components in traditional Chinese medicinal formula, Guanxin II, by HPLC, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 26, 469–482.
- 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, USA, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Sly, W.S. ve Hu, P.Y., 1995. Human carbonic-anhydrases and carbonic-anhydrase deficiencies, Annual Review of Biochemistry, 64, 375-401.
- Smith, K. S. and Ferry, J. G., 2000. Prokaryotic Carbonic Anhydrases, FEMS Microbiology Reviews, 24, 335-366.
- Spiller, G. A., 1997. Basic metabolism and physiological effects of the methylxanthines, Caffeine, CRC Press.
- Sonmez, F., Bilen, C., Sumersan, S., Gencer, N., Isik, S., Arslan, O. ve Kucukislamoglu, M., 2014. In vitro inhibition effect and structure-activity relationships of some saccharin derivatives on erythrocyte carbonic anhydrase I and II'', Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry, 29,1, 118-123.
- Sosulski, F., Krygier, K. ve Hogge, L. 1982. Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic acids. 3. Composition of Phenolic acids in Cereal and Potato Flours. J. Agric. Food Chem., 30, 337-340.
- Spacil, Z., Novakova, L. ve Solich, P., 2008. Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography. Talanta, 76, 189-199.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D.N. ve Christianson, D.W., 1998. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: Molecular basis of isozyme-drug discrimination, Protein Science, 7, 556-563.
- Stodt, U., ve Engelhardt, U. H., 2013. Progress in the analysis of selected tea constituents over the past 20years. Food Research International, 53(2), 636–648.
- Supuran, C. T. ve Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors - Part 94, 1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents?, European Journal of Medicinal Chemistry, 35, 867-874.

- Supuran, C.T. ve Scozzafava, A., 2007. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 15, 4336-4350.
- Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrases: catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles. In carbonic anhydrase. its inhibitors and activators (Supuran, C.T. vd., eds), 1-23, CRC Press.
- Supuran, CT. ve Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors, Current Medicinal Chemistry, 1, 61-97.
- Supuran, C. T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20,12, 3467-74.
- Supuran, C. T., 2016. Structure and Function of Carbonic Anhydrases, Biochemical Journal, 473, 2023-2032.
- Supuran C. T., 2008. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. Nat Rev Drug Discov., 7, 168-181.
- Supuran, C. T., 2012. Structure-Based Drug Discovery of Carbonic Anhydrase Inhibitors. J Enzyme Inhib Med Chem, 27, 759-772.
- Supuran, C. T., 2011. Bacterial Carbonic Anhydrases as Drug Targets: Toward Novel Antibiotics?, Front Pharmacol, 2, 34.
- Supuran, C. T. ve Scozzafava, A., 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Therapeutic Potential, Exp. Opin. Ther. Patents, 10, 575-600.
- Supuran, C. T. and Scozzafava, A. 1999. Carbonic Anhydrase Activators: Amino Acyl/Dipeptidyl Histamine Derivatives Bind with High Affinity to Isozymes I, II and IV and Act as Efficient Activators. Bioorg. Med. Chem., 7, 2915-2923.
- Swartz, M., 2010. Hplc Detectors: A Brief Review. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 33, 9-12, 1130-1150.
- Tang, K. S. C., Konczak, I., ve Zhao, J.,2016. Identification and quantification of phenolics in Australian native mint (*Mentha australis* R. Br.), Food Chemistry, 192, 698-705.
- Tan, J., Engelhardt, U. H., Lin, Z., Kaiser, N., ve Maiwald, B., 2017. Flavonoids, phenolic acids, alkaloids and theanine in different types of authentic Chinese white tea samples, Journal of Food Composition and Analysis, 57, 8-15.
- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G. ve Polissiou, M., 1995. Determination of Saffron (*Crocus sativus* L.) Components in Crude Plant Extract Using High-Performance Liquid Chromatography-UV-Visible Photodiode-Array Detection-Mass Spectrometry, Journal of Chromatography A, 699, 107-118.

- Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D. ve Supuran, C. T., 2006. Carbonic Anhydrase Activators. Activation of Isozymes I, II, IV, VA, VII and XIV with L- and D-Histidine and Crystallographic Analysis of Their Adducts with Isoform II: Engineering Proton Transfer Processes within The Active Site of An Enzyme, Chemistry, 12, 7057-7066.
- Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D. ve Supuran, C. T., 2006. Carbonic Anhydrase Activators. Activation of Isoforms I, II, IV, VA, VII and XIV with L- and D-Phenylalanine and Crystallographic Analysis of Their Adducts with Isozyme II: Sterospecific Recognition within the Active Site of an Enzyme and Its Consequences for the Drug Design., J. Med. Chem., 49, 3019-3027.
- Tomas-Barberan, F. A. ve Clifford, M. N., 2000. Dietary Hydroxybenzoic acid Derivatives and Their Possible Role in Health Protection, J. Sci. Food Agric., 80, 1024- 1032.
- Tomas-Barberan, F.A. ve Clifford, M.N., 2000. Flavanones, Chalcones and Dihydrochalcones-Nature, Occurence and Dietary Burden, J. Sci. Food Agric., 80, 1073-1080.
- Topcu, G., 2006. Bioactive triterpenoids from *Salvia species*, Journal of Natural Products, 69,3, 482-487.
- Tripp, B. C., Smith, K. ve Ferry, J. G., 2001. Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme, The Journal of Biological Chemistry. 276, 48615- 48618.
- Tumbas, V.T., Canadanovic-Brunet, J.M., Cetojevic-Simin, D.D., Cetkovic, G.S., Dilas, S.M. ve Gille L., 2012. Effect of rosehip (*Rosa canina* L .) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells, Journal of the Science of Food and Agriculture, 92,6, 1273–1281.
- Verpoorte, J.A, Mehta S., ve Edsall J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C, Journal of Biological Chemistry, 242, 4221-4229.
- Vallverdú-queralt, A., Regueiro, J., Martínez-huélamo, M., Fernando, J., Alvarenga, R., Neto, L., ve Lamuela-raventos, R. M., 2014. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary , thyme , oregano , cinnamon , cumin and bay, Food Chemistry, 154, 299–307.
- Vinson, J. A, Teufel, K. ve Wu. N., 2004. Green and Black Teas Inhibit Atherosclerosis by Lipid, Antioxidant , and Fibrinolytic Mechanisms, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 10, 3661-3665.
- Weber, B., Herrmann, M., Hartmann, B., Joppe, H., Schmidt, C. O., ve Bertram, H. J., 2008. HPLC / MS and HPLC / NMR as hyphenated techniques for accelerated characterization of the main constituents in Chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert), European Food Research and Technology, 226,755–760.

- Wilbur K. M. ve Anderson N.G., 1948. Carbonic Anhydrase Colorimetric Determination, Electrometric And Journal of Biological Chemistry. 176, 147-154.
- Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., ve Liu, X., 2004. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia, Food Chemistry, 84, 253–263.
- Yilmaz, Y., 2006. Novel uses of catechins in foods, Trends in Food Science & Technology, 17,2, 64–71.
- Zimmermann, B.F., Walch, S.G., Tinzoh, L.N., Stühlinger, W., ve Lachenmeier, D.W., 2011. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea), Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 24, 2459-2464.



7. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Raporu

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Gıda Katkı Maddelerinin Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkileri”		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2015/119		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Öğr.Gör.Ayça AKTAŞ KARAÇELİK		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalı		
	TEZ DANIŞMANI/DİĞER ARAŞTIRICILAR, UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Murat KÜÇÜK		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>


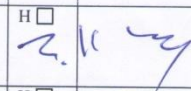


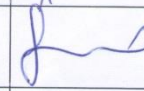

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>		

Ek 1'in devamı

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 5	Tarih: 20/07/2015
	Prof.Dr.Murat KÜÇÜK'ün sorumluluğunda yürütülen Öğr.Gör.Ayça AKTAŞ KARAÇELİK'e ait "Gıda Katkı Maddelerinin Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkileri" başlıklı 2015/119 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Evrim ÖZKORUMAK Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

09.10.1984 tarihinde Iğdır'da doğdu. 2001 yılında Iğdır Lisesi'nden mezun oldu. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında Kimya bölümünden Kimyager ünvanıyla onur öğrencisi olarak mezun oldu. İkinci üniversite olarak 2007 yılında kayıt yaptırdığı Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. 2009 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı. 2010-2011 yılında AB Socrates-Erasmus programı ile yüksek lisans tez aşamasını Belçika Gent Üniversitesi'nde tamamladıktan sonra 2012 yılında mezun oldu. Ara vermeden KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalında Doktora programına başladı. 2012 yılında Giresun Üniversitesi Espiye Meslek Yüksekokulu'nda Öğretim Görevlisi olarak göreve başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.