BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRUNUS SPINOSA L. TÜRÜNÜN MEYVE EKSTRAKSİYONUNDAKİ FENOLİK MADDE VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN YÜZEY YANIT METODOLOJİSİ İLE OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif VELİ BAYSAN

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ece SEVGİ

ŞUBAT 2021

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRUNUS SPINOSA L. TÜRÜNÜN MEYVE EKSTRAKSİYONUNDAKİ FENOLİK MADDE VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN YÜZEY YANIT METODOLOJİSİ İLE OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif VELİ BAYSAN
(175313002)

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Yüksek Lisans Programı

ŞUBAT 2021

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 175313002 numaralı Yüksek Lisans öğrencsi Elif VELİ BAYSAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "*PRUNUS SPINOSA* L. TÜRÜNÜN MEYVE EKSTRAKSİYONUNDAKİ FENOLİK MADDE VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN YÜZEY YANIT METODOLOJİSİ İLE OPTİMİZASYONU" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Ece SEVGİ** .....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Gülay ECEVİT GENÇ** .....
İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr.Üyesi. Çağla KIZILARSLAN HANÇER .....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : 26 Mart 2021
Savunma Tarihi : 8 Şubat 2021

Babama,

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince beni destekleyen, tavsiye ve yönlendirmeleri ile her zaman yanımda olan destek ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Ece Sevgi'ye teşekkürlerimi sunarım.
Tez çalışmamda, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, İLMER Merkezinde liyafilizatör ile çalışma imkanı sunan İLMER Müdür yardımcısı Doç. Dr. Aydan Dağ'a, çalışmalarıma yardımcı olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalından Dr. Öğr. Üyesi Belma ZENGİN KURT'a, Farmasötik Botanik Anabilim Dalından Arş. Gör. Betül BÜYÜKKILIÇ ALTINBAŞAK'a ve çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Fitoterapi Merkezinde çalışma imkanı sunan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Prof. Dr. Murat KARTAL'a ve çalışmalarıma yardımcı olan merkez çalışanları Kim. Kevser SALİHLER başta olmak üzere Bezmialem Fitoterapi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİTEM) çalışanlarına teşekkür ederim.
Bugünlere ulaşmamın sebebi, yürüdüğüm yolda beni hep sonsuz sabır ve emek ile destekleyen, koşulsuz şartsız seven 11.03.2017'de bedenen ayrıldığım ve ruhen hala her an yanımda olan canım babam Hüseyin VELİ'ye sonsuz teşekkür ederim.
Hayatımın her anında olduğu gibi tez süresince maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan annem Hamdiye VELİ başta olmak üzere, yeğenim Yunus Emre Veli'ye, abim Mustafa VELİ, ablalarım Ayşe VELİOĞLU, Rahime VELİOĞLU, Aysel VELİ ve Zeynep Bilgin VELİ YÜCEL'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.
Çalışmalarımın her safhasında bana destek olan eşim Mehmet BAYSAN'a ve BAYSAN ailesine sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.
Ve ailemizin en küçük üyesi Hüseyin Kerem VELİ'ye sevgilerimi sunarım.
Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 4.2019/28 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Şubat 2021

Elif Veli Baysan
(Diyetisyen)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Elif Veli Baysan

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ... **iv**
BEYAN ... **v**
İÇİNDEKİLER ... **vi**
KISALTMALAR ... **viii**
SEMBOLLER ... **ix**
TABLO LİSTESİ ... **x**
ŞEKİL LİSTESİ ... **xi**
ÖZET ... **xiii**
SUMMARY ... **xv**
1. GİRİŞ VE AMAÇ ... **1**
2. GENEL BİLGİLER ... **4**
2.1 *Prunus spinosa* L. Türünün Taksonomik Sınıflandırması ... 4
2.1.1 Rosaceae familyasının özellikleri ... 4
2.1.2 *Prunus* cinsinin genel morfolojik özellikleri ... 5
2.1.3 *Prunus spinosa* L. türü ... 7
2.1.3.1 Botanik özellikleri ... 7
2.1.3.2 Yöresel adları ... 9
2.1.3.3 Geleneksel kullanımı ... 10
2.2 Fenolik Bileşikler ... 11
2.3 Flavonoidler ... 12
2.4 Antosiyaninler ... 13
2.5 Serbest Radikaller ... 14
2.5.1 Reaktif oksijen türleri ... 14
2.5.2 Reaktif nitrojen türleri ... 16
2.5.3 Serbest radikallerin doku ve hücrelere etkileri ... 17
2.5.3.1 Serbest radikallerin lipidlere etkisi ... 17
2.5.3.2 Serbest radikallerin proteinlere etkisi ... 17
2.5.3.3 Serbest radikallerin DNA'ya etkisi ... 18
2.5.3.4 Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi ... 18
2.5.4 Antioksidanlar ve savunma mekanizmaları ... 18
2.5.5 Antioksidanların sınıflandırılması ... 19
2.5.5.1 Sentetik kaynaklı antioksidanlar ... 19
2.5.5.2 Doğal kaynaklı antioksidanlar ... 19
2.5.6 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri ... 20
2.6 *Prunus spinosa* L. Türü ile İlgili Literatür Araştırması ... 20

3. GEREÇ VE YÖNTEM 28
3.1 Gereç 28
3.1.1 Bitkisel materyal 28
3.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler 29
3.1.3 Kullanılan cihazlar 29
3.2 Yöntem 30
3.2.1 Yüzey yanıt yöntemi 30
3.2.2 Ekstraksiyon yöntemi 31
3.2.3 Toplam fenolik madde tayini 35
3.2.3.1 Folin-Ciocalteu yöntemi 35
3.2.4 Toplam flavonoid tayini 36
3.2.4.1 Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi 36
3.2.5 Toplam antosiyanin tayini 36
3.2.5.1 pH diferansiyel yöntemi 37
3.2.6 Antioksidan aktivite tayini 37
3.2.6.1 DPPH yöntemi 38
3.2.6.2 ABTS yöntemi 38
3.2.6.3 İstatistiksel analizler 39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 40
4.1 Elde Edilen Ekstrelerin Yüzde Verimlilik Değerleri 40
4.2 Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini Bulguları 41
4.3 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini Bulguları 45
4.4 Toplam Antosiyanin Madde Miktar Tayini Bulguları 47
4.5 Antioksidan Aktivite Tayininin Bulguları 49
4.5.1 DPPH serbest radikal giderme bulguları 50
4.5.2 ABTS serbest radikal giderme bulguları 52
4.6 Yüzey Yanıt Metodoloji Sonuçları İle İdeal Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi 53
4.6.1 Toplam fenolik madde miktarının optimizasyonu 53
4.6.2 Toplam flavonoid madde miktarının optimizasyonu 54
4.6.3 Toplam antosiyanin madde miktarının optimizasyonu 58
4.6.4 DPPH radikal giderme aktivitesinin optimizasyonu 62
4.6.5 ABTS radikal giderme aktivitesinin optimizasyonu 65
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 67
KAYNAKLAR 71
ÖZGEÇMİŞ 80

KISALTMALAR

ABTS : 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6 sülfonik asit)
BHT : Bütillenmiş hidroksi toluen
DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EtOH : Etanol
FDA : United State Food and Drug Administration
FCR : Folin-Ciocalteu reaktifi
H_2O : Su
IC_{50} : % 50 inhibisyona ulaşmak için gerekli antioksidan derişimi
IU : Uluslararası Birim
ROS : Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RNS : Reactive Nitrogen Species (Reaktif Nitrojen Türleri)
pH : Hidrojen gücü
UV-VIS : Ultraviyole Görünür Bölge

SEMBOLLER

g **:** Gram
mg **:** Miligram
ml **:** Mililitre
µl **:** Mikrolitre

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Reaktif oksijen türleri (ROS). 15
Tablo 2.2 : Reaktif nitrojen türleri (RNS). 16
Tablo 3.1 : Bağımsız değişken ve seviyeleri. 30
Tablo 3.2 : Deney tasarımı. 31
Tablo 3.3 : % Antosiyanin hesabındaki formülün birimleri. 37
Tablo 4.1 : Meyvede belirlenen yüzde verimlilik miktarları. 39
Tablo 4.2 : Meyvede belirlenen ortalama yüzde verimlilik miktarları. 41
Tablo 4.3 : Meyvede belirlenen ortalama fenolik miktarları. 43
Tablo 4.4 : Meyvede belirlenen ortalama flavonoid miktarları. 46
Tablo 4.5 : Meyvede belirlenen ortalama antosiyanin miktarları. 48
Tablo 4.6 : DPHH serbest radikal giderme IC_{50} sonuçları. 50
Tablo 4.7 : ABTS serbest radikal giderme IC_{50} sonuçları. 52
Tablo 4.8 : Toplam fenolik madde miktarı için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri. 54
Tablo 4.9 : Toplam flavonoid madde miktarı için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri. 54
Tablo 4.10 : Toplam flavonoid madde miktarı optimizasyonu için Design Expert-12'nin kuartik denklemleri ile varyans (ANOVA) analizleri. 55
Tablo 4.11 : Toplam antosiyanin madde miktarı için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri. 58
Tablo 4.12 : Toplam antosiyanin madde miktarı için Design Expert-12'de kakekök dönüşümlü varyans (ANOVA) analizleri. 59
Tablo 4.13 : Toplam antosiyanin madde miktarı optimizasyonu için Design Expert-12'nin karekök dönüşümlü kuadratik denklemleri ile varyans (ANOVA) analizleri. 59
Tablo 4.14 : Toplam DPPH radikal giderme aktivitesi için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri. 62
Tablo 4.15 : DPPH radikal giderme aktivitesinin optimizasyonu için Design Expert-12'nin linear denklemleri ile varyans (ANOVA) analizleri. 63
Tablo 4.16 : Toplam ABTS radikal giderme aktivitesi için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri. 66
Tablo 4.17 : Optimum koşulların karşılaştırılması. 66

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : *Prunus cocomilia* L. ... 6
Şekil 2.2 : *Prunus divaricata* Ledeb ... 6
Şekil 2.3 : *Prunus* x *domestica* L. ... 7
Şekil 2.4 : *Prunus spinosa* L. ... 7
Şekil 2.5 : Türkiye'de *Prunus spinosa* türünün yayılış alanları. ... 8
Şekil 2.6 : *Prunus spinosa* türünün dünyadaki yayılış alanları. ... 9
Şekil 2.7 : Genel flavonoid yapısı. ... 12
Şekil 2.8 : Antosiyaninlerin temel yapısı. ... 13
Şekil 2.9 : Haber Weiss ve Fenton reaksiyonu ... 16
Şekil 3.1 : *Prunus spinosa* meyvelerinin toplandığı lokalite. ... 28
Şekil 3.2 : *Prunus spinosa* türünün genel görünüşü. ... 28
Şekil 3.3 : *Prunus spinosa* meyveleri. ... 29
Şekil 3.4 : Etanol ekstrelerinin hazırlanması. ... 32
Şekil 3.5 : Ekstrelerin çalkalamalı inkübatörde bekletilmesi. ... 32
Şekil 3.6 : Ekstrelerin süzülmesi. ... 33
Şekil 3.7 : Su ekstrelerinin liyafilizatörde kurutulması. ... 33
Şekil 3.8 : Etanolün döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılması. ... 34
Şekil 3.9 : Kuru ekstre. ... 35
Şekil 4.1 : Gallik asit kalibrasyon eğrisi. ... 42
Şekil 4.2 : Ortalama fenolik madde miktar grafiği. ... 43
Şekil 4.3 : Kersetin kalibrasyon eğrisi. ... 45
Şekil 4.4 : Ortalama flavonoid madde miktarı grafiği. ... 46
Şekil 4.5 : Ortalama antosiyanin madde miktarı grafiği. ... 48
Şekil 4.6 : DPPH serbest radikal giderme IC_{50} sonuçları grafiği. ... 51
Şekil 4.7 : ABTS serbest radikal giderme IC_{50} sonuçları grafiği. ... 53
Şekil 4.8 : İncelenen parametrelerin toplam flavonoid madde miktarı üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi fonksiyonuna göre) ... 56
Şekil 4.9 : İncelenen parametrelerin toplam flavonoid madde miktarı üzerindeki etkisi (Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu fonksiyonuna göre). ... 56
Şekil 4.10 : İncelenen parametrelerin toplam flavonoid madde miktarı üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu fonksiyonuna göre). ... 57
Şekil 4.11 : Toplam flavonoid madde miktarının optimizasyonu. ... 57
Şekil 4.12 : Modelde öngörülen değerler ile deneysel olarak elde edilen toplam flavonoid madde miktarı değerleri arasındaki ilişki. ... 58

Şekil 4.13 : İncelenen parametrelerin toplam antosiyanin madde miktarı üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi fonksiyonuna göre). 60
Şekil 4.14 : İncelenen parametrelerin toplam antosiyanin madde miktarı üzerindeki etkisi (Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu fonksiyonuna göre). .. 60
Şekil 4.15 : İncelenen parametrelerin toplam antosiyanin madde miktarı üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi fonksiyonuna göre). 61
Şekil 4.16 : Toplam antosiyanin madde miktarının optimizasyonu. 61
Şekil 4.17 : Modelde öngörülen değerler ile deneysel olarak elde edilen toplam antosiyanin madde miktarı değerleri arasındaki ilişki..... 62
Şekil 4.18 : İncelenen parametrelerin DPPH radikal giderme aktivitesi üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi fonksiyonuna göre). 64
Şekil 4.19 : İncelenen parametrelerin DPPH radikal giderme aktivitesi üzerindeki etkisi (Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu fonksiyonuna göre). .. 64
Şekil 4.20 : DPPH radikal giderme aktivitesi madde miktarının optimizasyonu..... 65
Şekil 4.21 : Modelde öngörülen değerler ile deneysel olarak elde edilen DPPH radikal giderme aktivitesi değerleri arasındaki ilişki. 65

PRUNUS SPINOSA L. TÜRÜNÜN MEYVE EKSTRAKSİYONUNDAKİ FENOLİK MADDE VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN YÜZEY YANIT METODOLOJİSİ İLE OPTİMİZASYONU

ÖZET

Fonksiyonel gıdalar veya bitki bazlı gıdalar son zamanlarda birçok bilim insanı ve gıda üreticisi için ilgi çekici bir konu olmuştur. Son yıllarda yapılan araştırmalarla sağlıklı beslenmede antioksidan kapasitesi yüksek besinlerin kullanılması tercih edilmektedir. Antioksidan içeriği yüksek olan besinlere olan ilginin artmasıyla birlikte bu yöndeki araştırma sayısı gittikçe artmaktadır. Yüksek antioksidan içeriğine sahip olan gıdalar, vücutta meydana gelen serbest radikallerin oluşumunu azaltarak serbest radikallerden kaynaklanan kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları önlemede ve yaşlanma sürelerini geciktirmede önemli rol oynamaktadır. Yeterli, dengeli ve sağlıklı beslenme konusundaki bilinçlenme ile birlikte sağlık açısından pek çok faydası olduğu yıllardır bilinen ve antioksidan maddelerce zengin olduğu bildirilen meyve ve sebzelerin önemi daha da artmıştır. Bu kapsamda antioksidan aktivite açısından önemli olan *Prunus spinosa* L. türü ile ilgili ideal ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Ekstraksiyon çalışmalarında karşılaşılan en büyük zorluklardan biri bağımlı değişken üzerindeki istenmeyen etkenlerin etkisini ortadan kaldırmanın zorluğudur. Optimizasyon çalışmalarında istenen amaca ulaşmada bu zorluğu kontrol altına alabilmek için deney tasarım yöntemleri ve yüzey yanıt metodolojisi kullanılmaktadır. Bu yöntemler, ürün kalitesini arttırmak ya da maliyeti düşürmek için optimizasyonu sağlamada ve ideal ekstraksiyon yöntemini belirlenmesinde gıda, ilaç, kimya, tarım gibi birçok alandaki çalışmalarda yerini almıştır. Bu çalışmada antioksidan, aktiviteleri yönünden zengin değerlere sahip yabani meyvelerden biri olan *Prunus spinosa* L. bitkisinin meyvelerinin verim, toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, toplam antosiyanin ve serbest radikalleri yakalama aktivitesi (DPPH-ABTS) üzerine, çözücü, sıcaklık ve süre koşullarının etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Optimizasyon için

yüzey yanıt yöntemi kullanılarak 3 tekrarlı 20 ekstre elde edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Toplam antosiyanin içeriği pH diferansiyel metodu ile toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu yöntemiyle, toplam flavonoid içeriği alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitesi için ABTS ve DPPH metodu kullanılmıştır.

Elde edilen *P. spinosa* meyve ekstrelerinde toplam fenolik madde miktarının 10,99-19,03 (gallik asit eşdeğer mg/g), toplam flavonoid madde miktarının 8,47-0,05 (kersetin eşdeğer mg/g) ve toplam antosiyanin madde miktarının 9,77-363,83 mgC3G/100 aralığında; serbest radikalleri yakalama aktivitesinin IC_{50} değerleri; 106,97-539,64 µg/ml (DPPH) ve 49,34-101,59 µg/ml (ABTS) aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

Bağımsız değişken olarak belirlenen ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu parametrelerinin etkisi belirlemek için kullanılan yüzey yanıt metodolojisi sonuçlarına göre *P. spinosa* meyvesinin ekstresindeki optimum koşullar; toplam flavonoid madde miktarında sıcaklık ve sürenin, antosiyanin miktarında etanol konsantrasyonunun ve DPPH radikal giderme aktivitesinde ise sıcaklığın etkili olduğu istatiksel olarak belirlenmiştir.

P. spinosa meyve ekstrelerinin toplam fenolik madde ve serbest radikalleri yakalama aktivitesince zengin olduğu sıcaklık, süre ve çözücü konsantrasyonu parametreleri için yüzey yanıt metodolojisi ile belirlenen optimum koşulların türden yararlanma çalışmalarına sağlayacağı katkı oldukça önemlidir.

Anahtar Kelimeler: *Purunus spinosa* L., Yüzey Yanıt Metodolojisi, Optimizasyon Antioksidan, Fenolik Madde.

OPTIMIZATION OF PHENOLICS SUBSTANCE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES IN THE EXTRACTION FROM *PRUNUS SPINOSA* L. FRUITS BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

SUMMARY

Functional foods or plant-based foods have recently been an interesting topic for many scientists and food manufacturers. In recent years, it is preferred to use foods with high antioxidant capacity for healthy nutrition. With the increasing interest in foods with high antioxidant content, the number of studies in this direction is increasing. Foods with high antioxidant content play an important role in preventing various diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases caused by free radicals and delaying aging by reducing the formation of free radicals in the body. With the awareness about adequate, balanced, and healthy nutrition, the importance of fruits and vegetables, which have been known for many years and reported to be rich in antioxidants, has increased even more. In this context, it is important to determine the ideal extraction method for the *Prunus spinosa* L. species, which is important in terms of antioxidant activity.

One of the biggest difficulties encountered in extraction studies is the difficulty of eliminating the effect of undesirable factors on the dependent variable. Experimental design technique and surface response methodology are used to control this difficulty in achieving the desired goal in optimization studies. These techniques have taken their place in many fields such as food, medicine, chemistry, agriculture in providing optimization to increase product quality or reducing costs, and determining the ideal extraction method.

In this study, it was aimed to determine the effect of solvent, temperature, and time conditions on yield, total phenolic substance, total flavonoid, total anthocyanin, and free radical capture activity (DPPH-ABTS) of the fruits of the *Prunus spinosa* L. plant, which is one of the wild fruits with rich values in terms of antioxidant, anticarcinogenic

activities. For optimization, 20 extracts in 3 replicates were obtained using the response surface methodology and the results were evaluated.

It was determined that the total amount of phenolic substance in the *P. spinosa* L. fruit extracts obtained was 10.99-19.03 (gallic acid equivalent mg/g), the total amount of flavonoid substance was 8.47-0.05 (quercetin equivalent mg/g), and the total amount of anthocyanin substance ranged from 9.77-363.83 mgC3G/100g; that the IC_{50} values of free radical capture activity varied between 106.97-539.64 µg/ml (DPPH) and 49.34-101.59 µg/ml (ABTS).

According to the results of the surface response methodology used to determine the effect of extraction temperature, extraction time, and ethanol concentration parameters defined as independent variables, it was statistically determined that the optimum conditions in the extract of *P. spinosa* fruit, the temperature, and time in total flavonoid content, ethanol concentration in anthocyanin content and temperature in DPPH radical scavenging activity were effective.

The optimum conditions determined by the response surface methodology for the parameters of temperature, time, and solvent concentration, at which the *P spinosa* L. fruit is rich in total phenolic material and free radical capture activity, will contribute to the exploitation studies of the species.

Keywords: *Prunus spinosa* L., Response Surface Methodology, Optimization, Antioxidant, Phenolic Substance.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğadaki tüm bitkiler, hayvanlar ve insanlar bir denge içindedir. İnsanlar çok eski zamanlardan bu yana bitkilerden çeşitli amaçlar ile yararlanmaktadır. Mitolojide bitkilerden tanrıların insana verdiği en değerli armağan olarak bahsedilmektedir [1]. Bitkiler halk tarafından şifalı bitkiler olarak adlandırılmakta ve doğal ilaç olarak kullanılmaktadır. Halk ilaçlarının çoğu bitki kökenlidir. Her hastalığın tedavisinin doğada bulunabileceği inancı, bitkiler üzerinde birçok araştırma yapılmasını sağlamış ve elde edilen sonuçlar ilaç üretimi için önemli bir kaynak oluşturmuştur. Bitkiler ile geleneksel tedaviye olan ilgi günümüzde oldukça artmaktadır ve bilimsel çalışmaların sayısı giderek hız kazanmaktadır [2]. Son zamanlarda doğal kaynaklı ürünlerin kullanımı eğiliminin yaygınlaşması yeniden geleneksel tedaviye olan ilginin artmasını sağlayan faktörlerden biri olmuştur.

Fonksiyonel gıdalar veya bitki bazlı gıdalar son zamanlarda birçok bilim insanı ve gıda üreticisi için ilgi çekici bir konu olmuştur [3]. Son yıllarda yapılan araştırmalarla sağlıklı beslenmede antioksidan kapasitesi yüksek besinlerin kullanılması tercih edilmektedir. Antioksidan içeriği yüksek olan besinlere olan ilginin artmasıyla birlikte bu yöndeki araştırma sayısı gittikçe artmaktadır. Yüksek antioksidan içeriğine sahip olan gıdalar, vücutta meydana gelen serbest radikallerin oluşumunu azaltarak serbest radikallerden kaynaklanan kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları önlemede ve yaşlanma sürelerini geciktirmede önemli rol oynamaktadır [4].

Meyve ve sebzeler bileşimlerindeki çeşitli fitokimyasallar nedeniyle sağlık üzerindeki olumlu etkileri ile uzun zamandır bilinmektedir. Bu besin maddeleri taze olarak tüketilmelerinin yanında, gıda sektörü tarafından meyve suyu ve konserve şeklinde işlenebilmekte ya da dondurularak veya kurutularak da tüketime hazırlanmaktadır. Bununla birlikte antioksidanlarla zenginleştirilmiş gıdalar da giderek önem kazanmıştır [5].

Özellikle meyvelerde bulunan C vitamini, E vitamini ve β-karoten gibi tıbbi ve besleyici değeri yüksek olan flavonoid bileşenleri içerdikleri yüksek miktardaki

antioksidan etki ile özel bir ilgi çekmektedir [6, 7]. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan yabani meyvelerden biri de çakal eriği veya güvem olarak bilinen *Prunus spinosa* L. türüdür. *P. spinosa* meyvesi, antioksidan özelliği sayesinde vücutta oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirerek dışsal etmenler, yetersiz ve sağlıksız beslenme gibi çeşitli kaynakların sebep olduğu serbest radikallerin zararlarına karşı önleyici bir etkiye sahiptir [8-10].

P. spinosa fenolik maddeler ve flavonoid bakımından zengin içeriğe sahiptir [11]. Antioksidan aktivitesinin yanında, kardiyovasküler koruyucu, antienflamatuvar ve antibakteriyel aktivitelere de sahip olması sebebiyle beslenme açısından önemli bir kaynaktır [12]. Güvem bitkisinin sahip olduğu bu önemli özellikler içerdiği maddeler ve bu maddelerin standardizasyonu üzerine yapılan çalışmaları daha da önemli kılmaktadır.

Çalışmanın amacı, geleneksel kullanımı ve yapılan çalışmalar ile antioksidan aktivitesi olduğu bilinen *P. spinosa* (güvem) türünün meyvelerinden yararlanmada ideal ekstraksiyon yönteminin belirlenmesidir. Yeterli, dengeli ve sağlıklı beslenme konusundaki bilinçlenme ile birlikte sağlık açısından pek çok faydası olduğu yıllardır bilinen ve antioksidan maddelerce zengin olduğu bildirilen meyve ve sebzelerin önemi daha da artmıştır. Bu kapsamda antioksidan aktivite açısından önemli olan *P. spinosa* türü ile ilgili ideal ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi önem arz etmektedir. Ekstraksiyon çalışmalarında karşılaşılan en büyük zorluklardan biri bağımlı değişken üzerindeki istenmeyen etkenlerin etkisini ortadan kaldırmanın zorluğudur. Optimizasyon çalışmalarında istenen amaca ulaşmada bu zorluğu kontrol altına alabilmek için deney tasarım yöntemleri ve yüzey yanıt metodolojisi kullanılmaktadır. Bu yöntemler, ürün kalitesini arttırmak ya da maliyeti düşürmek için optimizasyonu sağlamada ve ideal ekstraksiyon yönteminin belirlenmesinde gıda, ilaç, kimya, tarım gibi birçok alandaki çalışmalarda yerini almıştır. Çalışmamızda yüzey yanıt metodolojisi kullanılarak meyvelerden elde edilecek ekstreler için fenolik madde ve antioksidan aktivite açısından ekstraksiyon yönteminin optimize edilmesi hedeflenmiştir. Hedeflenen amaç kapsamında belirlenen deney tasarımları ile *P. spinosa* meyve ekstrelerinde toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antosiyanin miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler Design-Expert-12 programında değerlendirilerek ideal ekstraksiyon yöntemi tespit edilmiştir. Yapılan

çalışmada yüzey yanıt metodoloji kullanılarak, *P. spinosa* meyveleri için ideal ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi ile gıda ve ilaç sanayine katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Prunus spinosa* L. Türünün Taksonomik Sınıflandırması

Prunus spinosa L. türünün taksonomik sınıflandırması aşağıda verilmiştir [13].

Regnum (Alem): Plantae (Bitkiler)

Subregnum (Altalem): Tracheobionta (İletim Demetli Bitkiler)

Divisio (Bölüm): Magnoliophyta (Çiçekli Bitkiler)

Classis (Sınıf): Magnoliopsida (Çift Çenekliler)

Order (Takım): Rosales

Familia (Aile): Rosaceae

Genus (Cins): *Prunus*

Species (Tür): *Prunus spinosa* L.

2.1.1 Rosaceae familyasının özellikleri

Türkiye florasındaki en önemli familyalardan biri olan Rosaceae yani gülgiller familyası, odunsu veya otsu, bazen de dikenli türlerden oluşmaktadır. Türlerin çoğu çok yıllıktır, az sayıda tek yıllık tür bulunmaktadır. Bitkilerde dikenler; yüzey dikeni (*Rosa, Rubus*) ya da gövde dikeni (*Crataegus, Prunus*) şeklindedir. Yapraklar almaşlı dizilmiş, nadiren karşılıklı, genellikle yaprak sapının tabanıyla birleşmiş bir stipula (kulakçık) bulunmakta, basit ya da bileşiktir, genellikle yaprak kenarları dişlidir. Çiçek durumu genellikle kısa sürgünlerin üzerindedir. Çiçekler hermafrodit veya tek eşeyli, aktinomorf, perigin veya epigindir. Genellikle hipantiyum içerirler. Çanak yapraklar 4−5, serbest, epikaliks bazılarında vardır. Taç yapraklar 4−5, serbest veya yoktur. Stamenler 1 ya da çok sayıdadır. Ovaryum üst durumlu veya alt durumludur. Karpel 1 veya çok sayıda ve serbesttir, sadece ± alt durumlu ovaryuma sahip cinslerde birleşiktir.

Meyve etli veya kuru aken, nuks, drupa ya da folikül tipindedir. Çoğunlukla agregat meyve taşırlar. Tohumlar genellikle endospermasız, besin maddeleri kotiledonlarda toplanmıştır [14, 15].

Türkiye'de Rosaceae familyası 36 cins ve 316 takson ile temsil edilmektedir [15].

2.1.2 *Prunus* cinsinin genel morfolojik özellikleri

Erikler genel ismi ile bilinen *Prunus* cinsi çoğunlukla kültüre alınmış türlerden oluşmaktadır. Doğal yayılış alanlarında orman içerisinde karışıma giren bir cinstir [14] Bu cinsin Türkiye'deki revizyonu Dönmez ve Yıldırımlı (2000) tarafından yapılmıştır [16].

Ağaç veya çalı formunda, bazı türleri dikenli, bazı türler dikensiz olan odunsu bitkilerdir. Kışın yapraklarını dökerler. Tomurcukları çok pullu, çok sıralı sarmal dizilmiştir. Kulakçıklar düşücüdür. Çiçekleri tek, çift veya küme halindedir. Çiçeklenme genellikle yapraklanmadan öncedir, nadiren yapraklanmayla birlikte oluşur. Çanak yaprak sayısı 5, taç yaprak sayısı 5(-7), stamenler 20-30(-40) ve iki sıra şeklinde dizilmiştir. Meyve etli ve usareli, üzeri mavimsi beyaz mum tabakası (buğulu) ile kaplıdır. Çekirdek yumurtamsı, hafif basık, yüzeyi düz ya da süslüdür. Tohum basık, yumurtamsı-eliptiktir [14, 16].

Browicz (1972) *Prunus* cinsinin Türkiye'de 5 türe ait 7 taksonu (*Prunus cocomilia* Ten var. *cocomilia, P. cocomilia* Ten var. *puberula* (Schneider) Browicz, *P. divaricata* Ledeb. subsp. *divaricata, P. divaricata* Ledeb. subsp. *ursina* (Kotschy) Browicz, *P. x domestica* L., *P. kurdica* Fenzl ex Fritsch, *P. spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) (Domin) olduğunu belirtmiştir [15].

Fakat Dönmez ve Yıldırımlı (2000)'nın yaptığı revizyon çalışması sonucunda *Prunus* cinsinin 4 türe ait 5 taksonla (*P. cocomilia* Ten., *P. divaricata* Ledeb., *divaricata* L., *P. divaricata* Ledeb., *pissardi* Koeh., *P. x domestica* L., *P. spinosa* L.) temsil edildiği belirlenmiştir.

Türkiye'de doğal olarak yetişen *Prunus* türlerinin teşhis anahtarı aşağıda verilmiştir. Türlerin meyveleri Şekil 2.1, 2.2, 2.3, 2.4'te gösterilmiştir [14].

1.Bitki dikenli; meyve genellikle 12(-15)x10 mm boyutlarında ve sürgünden dik çıkar……...***Prunus spinosa***

1.Bitki dikensiz ya da hafif dikenli meyve en az 15x12 mm boyutlarında

2.Çanak yapraklar geriye kıvrık; meyve sarkık, meyve sapları meyveden daha uzun……...…..***Prunus divaricata***

2.Çanak yapraklar dik ya da yayık, meyve sarkık ya da dik, meyve sapları genellikle meyveden kısa

3.Yapraklar 2-4 cm, oymalı dişli; bitki zayıf dikenli, meyve mayhoş, çiçek sapları (1-) 3-10 (-15) mm……...***Prunus cocomilia***

3.Yapraklar 4 cm'den daha uzun, testere dişli; dikensiz; meyve tatlı; meyve sapları 5-20 (-30) mm……...……***Prunus x domestica***

Şekil 2.1: *Prunus cocomilia* L.

Şekil 2.2: *Prunus divaricata* Ledeb.

Şekil 2.3: *Prunus* x *domestica* L.

2.1.3 *Prunus spinosa* L. türü

Prunus spinosa, Rosaceae familyasındaki çalı formunda bir türdür. Ülkemizde yaygın olarak Çakal eriği olarak bilinen bu tür Avrupa-Sibirya elementi olup, genel olarak 1-3 metre arası uzayabilen beyaz renkte hoş çiçekler açan, dikenli bir bitkidir. *P. spinosa* türü Şekil 2.4'de gösterilmiştir [15].

Şekil 2.4: *Prunus spinosa* L.

2.1.3.1 Botanik özellikleri

Dikenli çalı formunda, 1-2 (-3) m boyunda, tomurcuk ve genç sürgünler tüylü, nadiren çıplaktır. Tomurcuklar 1-2 x 1-1,5 mm, 2-3 grup halinde bulunur. Stipula 3-5 x 0,5-1,5 mm; düşücü, mızraksı, kenarları glandulardır. Yapraklar kısa yumuşak tüylü,

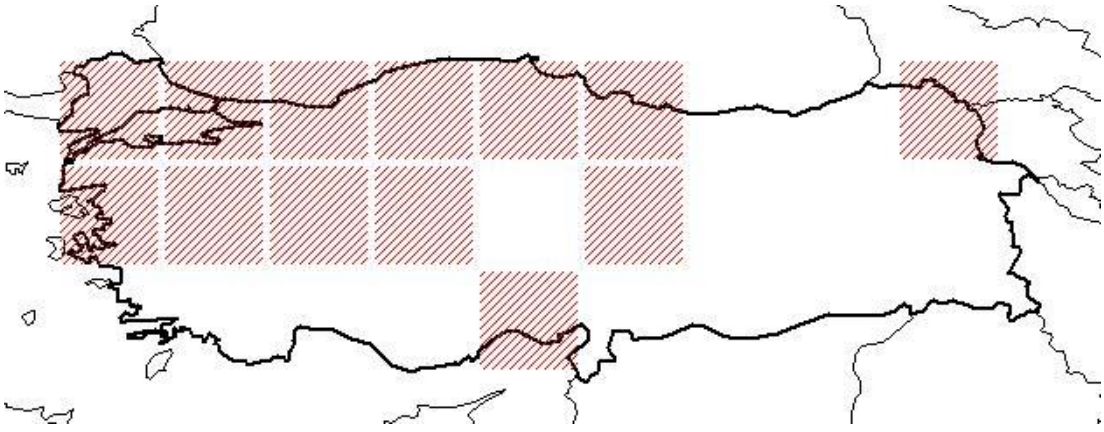
yaprak sapı 5-10(-20) mm, yaprak ayası (10-)20-30 x 8-15(-25) mm, genç sürgünlerde 90 x 40 mm'nin üzerindedir. Yapraklar ters yumurta şeklinde veya eliptik, kenarları testere dişli, oymalı dişli, glandular, yaprak ayasının tabanında geniş gland çiftleri vardır. Çiçekler 10-15 mm çapında, tek veya çift olarak bulunur. Çiçeklenme yapraklanmadan öncedir, nadiren yapraklanmayla beraber olur. Çiçek sapı 10-15 mm, meyvelerde 25 mm'ye ulaşır. Hipantiyum kubbemsi, 1,5-3,5 x 1,2-4 mm boyutunda, hem iç hem de dış kısımları tüylüdür. Çanak yaprakları 2-3 x 1,5-2 mm boyutunda, eliptik-dikdörtgenimsi ve uçta obtus, tüylü, nadiren çıplaktır. Taç yaprakları 3-4,5 x 2-4 mm boyutunda, beyaz, dairemsi, ters yumurtamsı-eliptiktir. Stamenlerin sayısı 15-18 olup, hipantiyum üzerinde bir sıra şeklinde dizilmişlerdir. Ovaryum çıplak, küremsi-ters yumurta şeklindedir. Meyve 10-15 mm, dik, yuvarlak veya yumurtamsı, donuk mavimsi-siyah mor renklidir ve ekşidir. Perikarpa yapışık olan çekirdek; 6-10 x 5-9 mm boyutunda, yüzeyi düz veya veya kabarcıklı, hafifçe yassı ve karın tarafında omurgalıdır. Tohum 5-7 x 3-5 mm; yumurtamsı, hafifçe yassı, boyuna çizgili, ucu sivridir [16].

Çiçeklenme zamanı: Mart-Mayıs

Meyve zamanı: Haziran-Eylül

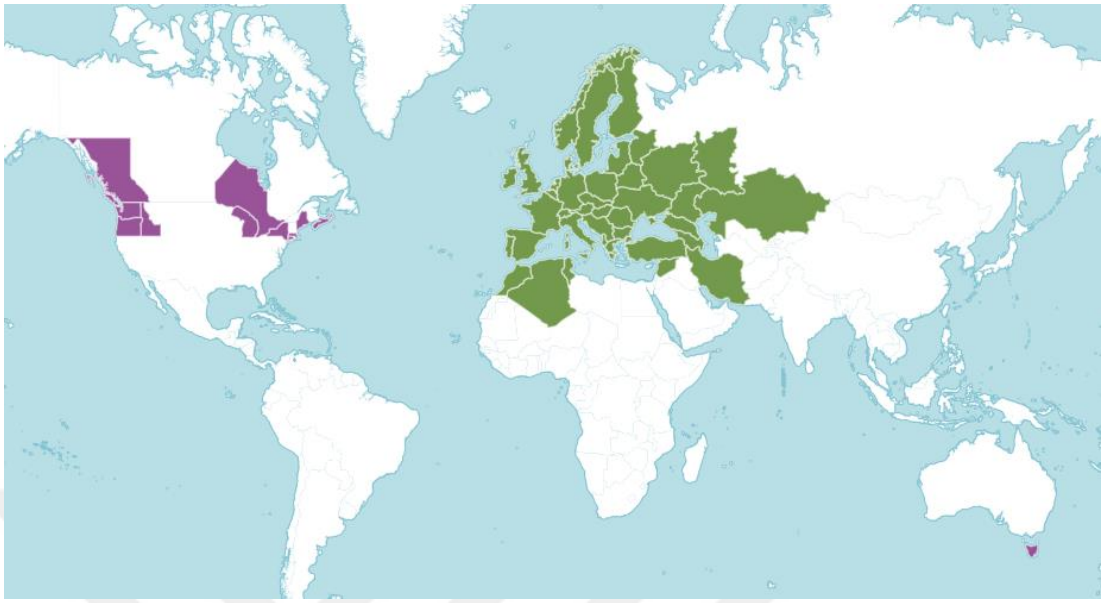
Yayılış gösterdiği yükselti: Deniz seviyesi- 1700 m

Türkiye'deki Yayılışı: Türkiye'deki yayılış alanları Şekil 2.5'de gösterilmiştir (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A9, B1, B2, B3, B4, B6, C5) [13].



Şekil 2.5: Türkiye'de *Prunus spinosa* türünün yayılış alanları.

Dünyadaki Yayılışı: Avrupa, Batı Asya ve Kuzeybatı Afrika'daki yayılışı Şekil 2.6'da gösterilmiştir [17].



Şekil 2.6: *Prunus spinosa* türünün dünyadaki yayılış alanları.

2.1.3.2 Yöresel adları

Prunus spinosa türünün Türkiye'de farklı yörelerde kullanılan birçok yöresel adı bulunmaktadır [18, 19]. Bu isimler aşağıda yer almaktadır.

- Avşar çalısı (Balıkesir)
- Çakal eriği (Afyon, Balıkesir, Kocaeli, Mersin)
- Dağ eriği (Aksaray, Çanakkale)
- Domuz eriği (Çanakkale, Manisa)
- Göğem eriği (İstanbul)
- Gövem (Çanakkale, Yalova)
- Güvem (İstanbul, Kırklareli, Kocaeli, Tekirdağ)
- Güvem dikeni, Güvem tikeni (Kırklareli)
- Güvem eriği (Edirne, İstanbul)
- Kuş eriği (Çorum)
- Paguşh (Yalova)
- Trınka (Kırklareli)

2.1.3.3 Geleneksel kullanımı

Ülkemizde ve dünyada *Prunus spinosa* bitkisinin yaprakları, çiçekleri özellikle de meyvelerinin geleneksel tedavide kullanımı bilinmektedir. Türkiye'de halk arasında meyvelerinin gıda olarak kullanımı oldukça yaygındır. Meyvesi ekşimsi bir tada sahip olduğu için genellikle, meyve suyu, marmelat, komposto, reçel ve turşu olarak hazırlanarak tüketimi tercih edilmektedir [20, 21]. Bitkinin genç filizleri yoğurt yapımında ve adet düzenlenmesinde kullanılmaktadır [22, 23].

Avrupa geleneğinde ilk önce yenebilir bir meyve kaynağı olarak ve daha sonra da tıbbi bir bitki kaynağı olarak 7.000 yılından beri bilinmektedir [24, 25]. İspanya'da dallarının infüzyonu hipertansiyon tedavisinde [26], yumuşatılmış meyvelerinin mide bağırsak rahatsızlıklarında kullanıldığından bahsedilmektedir [27]. Etnofarmakolojik kaynaklarda, çiçeklerinin vazoprotektif, antienflamatuvar, idrar söktürücü, detoksifiye edici olarak kullanıldığından bahsedilmektedir. Yine Avrupa'da kalp güçlendirici olarak kulanılmaktadır [28-31].

Ülkemizde türün tıbbi olarak; yapraklarının kabız için, çiçeklerinin diüretik, kurt düşürücü, meyvelerinin ise müshil olarak kullanımı vardır [32]. Bazı bölgelerde taze/kurutulmuş meyvelerinin; vücuda direnç kazandırdığı, kan yapımında etkisinin olduğu kayıtlıdır ve romatizmal kaynaklı ağrılarda yarar sağladığı için hoşaf şeklinde de tüketilmektedir [33]. Ayrıca meyveleri, geleneksel tedavide kanama durdurucu olarak, diüretik ve bağırsak fonksiyonlarını arttırmaya yardımcı olarak kulllanılmaktadır [8, 9, 32]. Meyve sularındaki antienflamatuvar etkisi sebebiyle ağız ve farenks mukozasında gargara şeklinde kullanımı da bulunmaktadır [34].

Türkiye'de farklı yörelerde halk ilacı olarak birçok kullanımı bildirilmiştir [35-37].

- Meyveleri taze olarak, marmelat ve reçel olarak üriner hastalıklarda, diyabette ve bronşit tedavisinde kullanılır (Kırklareli).
- Meyveli dallarından hazırlanan dekoksiyon,bir gece dışarıda bırakıldıktan sonra, günde 3 kere yemeklerden sonra, ağızda çalkalanarak, diş çürümelerine karşı ve diş ağrılarının giderilmesinde kullanılır (Gönen/Sarıköy).
- Meyvelerden hazırlanan dekoksiyon, dahilen, iltihaplı akciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Gönen/Sarıköy).
- Meyvelerden hazırlanan dekoksiyon, soğutulduktan sonra, dahilen, egzama tedavisinde kullanılır (Şile/Karabeyli).

- Taze meyveleri alkol içinde 30-40 gün kadar karanlıkta bekletildikten sonra dahilen astım ve bronşit tedavisinde kullanılır (Kırklareli/Pancarköy).
- İnfüzyon şeklinde hazırlanan olgun meyveleri diyabet tedavisinde kullanılır (İstanbul/Silivri).
- Ahlat, güvem ve kızılcık birlikte fıçıya konularak üzerine su eklenir ve ağzı kapatılır, olgunlaşınca suyu içilerek tansiyon düzenleyici ve diyabet tedavisinde kullanılır (Edirne/İpsala).

Ayrıca halk ilacı olarak özellikle Marmara Bölgesinde yer alan; İzmit'te, İstanbul/Çatalca'da ve Edirne/Lalapaşa'da diyabet tedavisinde [38-40], Kırklareli'de kalp hastalıklarında [41], Balıkesir/Gönen'de diş ağrısı ve böbrek taşı tedavisinde [42], yaygın olarak kullanıldığı etnobotanik çalışmalarla bildirilmiştir.

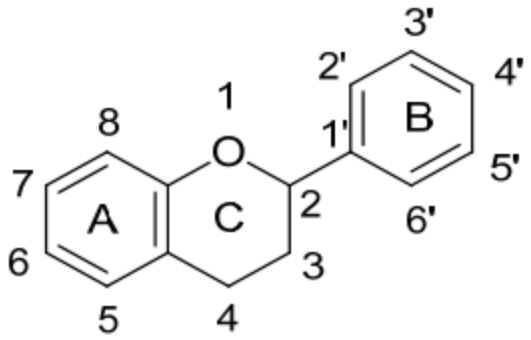
2.2 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler fonksiyonel gıdalarda ve bitkilerde oldukça fazla rastlanan ikincil bileşiklerdir [43]. Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin renginden ve tadından sorumlu bileşiklerdir. Bitkilerin savunma mekanizmalarını oluşturarak bitkilerin dayanıklılığını etkilemektedir. Bitkisel kaynaklı besinlerde az miktarda bulunan, ağızda buruk bir tat bırakan kırmızı mor renk veren bileşiklerdir [44]. Fenolik maddelerin içeriği; bitkinin türü, hava koşulları, olgunlaşma süresi, hasat etme zamanı, saklama koşulları ve hasat sonrası muhafazası gibi birçok faktöre göre değişiklik gösterir [45, 46]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fenolik bileşikler, sağlık üzerindeki olumlu etkileri ve özellikle bazı kanser türleri ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu olmalarıyla dikkat çekmektedir. Bu bileşikler serbest radikallerle reaksiyona girdiği için antioksidan özellik gösterirler. Antoksidan aktivite göstermelerinden dolayı gıda ve ilaç sektöründe yaygın bir şekilde kullanımları artmıştır [47, 48].

Fenolik bileşikler, en az bir hidroksil grubuyla en az bir aromatik halka içeren bileşiklerdir [49, 43]. Bitkilerdeki doğal fenolik bileşikler genellikle: fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, kumarinler, stilbenler ve lignanlar şeklinde sınıflandırılır. Flavonoidler besinlerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerdir [49, 50].

2.3 Flavonoidler

Flavonoidler; sayıları yaklaşık 6500 olan, bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerdir. Damarlı bitkiler tarafından sentezlenirler. Meyveler, sebzeler, yağlı tohumlar, otlar, baharatlar, tam tahıllar, çay, şarap, turunçgiller gibi birçok besinin bileşiminde bulunurlar [51, 30, 52]. Temel yapısı A, B ve C olarak adlandırılan halkalardan oluşmaktadır. 15 karbon atomlu 2-fenil benzopiron yapısı (C6-C3-C6) gösteren düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir [49]. Flavonoidlerin P vitamini olduğunu savunan araştırmalarda mevcuttur [53]. Flavonoidlerin temel yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: Genel flavonoid yapısı [54].

Flavonoidler; piran halkasının (C halkası) saturasyon, oksidasyon ve hidroksilasyon derecesine ve B ile C zincirlerinin bağlanma pozisyonlarına göre altı alt sınıfa ayrılırlar. Bunlar; flavonlar, flavonoller, flavanoller, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyaninlerdir [55, 56].

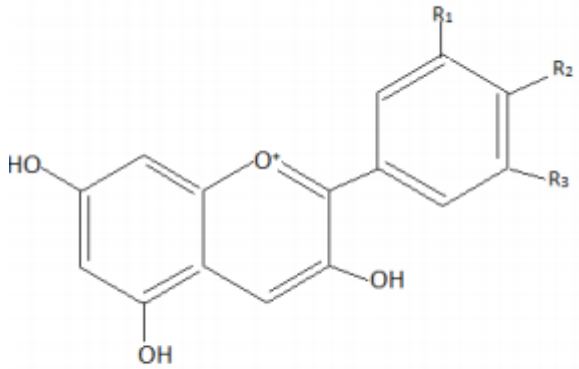
Gıdalarda yaygın olarak bulunan flavonoidler; antosiyanin olan malvidin 3-glikozitleri; kırmızı şarapta, flavonol olan kersetin; elma, soğan ve karabuğday çayında, flavanol olan epikateşin çikolatada, flavanon olan naringenin ve hesperidinin greyfurtta yüksek miktarlarda bulunmaktadır [57].

Flavonoid moleküllerinin antioksidan olarak görev yapmaları en iyi tanımlanan ortak özelliklerinden biridir. Bu moleküller antioksidan fonksiyonlarını doğrudan ve dolaylı radikal temizleme işlevi olarak iki farklı şekilde gerçekleştirirler. Birincisi, serbest radikallerin temizlenmesi olarak tanımlanan, bir radikalin tekli elektronlarının başka bir radikal oluşturmadan çift bağlı hale getirilmesi olarak gerçekleşmesidir. İkincisi ise minimum 6 farklı antioksidan mekanizması ile gerçekleşen mekanizmalardır [52].

Meyve ve sebzelerde bulunan flavonoidler antioksidan etki göstermesinin yanı sıra, antienflamatuvar, antihipertansif, antiaterojenik, antikarsinojenik ve antiproliferatif etki de göstermektedir [51, 52, 58, 59]. Sahip oldukları bu biyolojik aktivitelerinden dolayı sağlığın korunması ve hastalıkların iyileştirilmesi sürecinde flavonoidlerin beslenmedeki önemi artmıştır [60].

2.4 Antosiyaninler

Flavonoid bileşiklerinin en önemli gruplarından biri de antosiyaninlerdir. Antosiyanin terimi ilk kez 1985 yılında tanımlanmış olmasına rağmen, 1964 yılından beri pH indikatörü olduğu bilinmektedir [61]. Yapısal olarak ilk antosiyanin 1913 yılında mavi çiçekli *Centaurea cyanus* L. türünde tanımlanmıştır. Günümüzde yapısı belirlenmiş antosiyanin sayısı 600'ü aşmıştır [62, 63]. Antosiyaninler, glikozit formunda olmaları nedeniyle şekerler ve şeker olmayan kısımlardan (aglikon) meydana gelirler [64]. Yapıları incelendiğinde hidroksil bulunduran antosiyanidinlere şeker bağlanmasıyla oluşan ve yapılarındaki flavan halkası sebebiyle 15 C içeren bir flavonoid bileşik grubudur [65]. Antosiyaninin temel yapısı Şekil 2.8'de gösterilmiştir [66].



Şekil 2.8: Antosiyaninlerin temel yapısı [66].

Ayrıca meyve ve sebzelere kendine özgü pembe kırmızı ve mor rengini veren ve suda çözülebilen doğal pigmentlerden oluşan doğal bileşiklerdir [67, 63, 68]. İçerisindeki yoğun kırmızı siyah pigmentler sayesinde Avrupa Birliği mevzuatında E163 kodu ile doğal renklendirici olarak isimlendirilmiştir. Yaygın olarak doğal renklendiriciler ve doğal gıda boyası olarak kulanılmaktadır. Bu renkli pigmentler potansiyel farmasötik

bileşenlerdir [49, 69, 59]. Yapılan çalışmalarda antosiyaninlerin yüksek antioksidatif etkileri sayesinde, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, atherosklerozis, ülser, diyabet gibi hastalıkların risk faktörünü azalttığı rapor edilmiştir [70-74, 66]. Antosiyaninlerce yoğun olan bitkiler arasında yaban mersini, ahududu, üzüm, elma, patlıcan, kırmızı ve siyah havuç, kırmızı lahana ve siyah soya fasulyesi gelmektedir [75]. Dephinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin, peonidin ve petunidin en yaygın antosiyanidin türleridir [76].

2.5 Serbest Radikaller

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla birlikte serbest radikallerin hastalıklarla arasındaki bağlantının artmasıyla beraber serbest radikallere olan ilginin arttığı gözlenmiştir. Hayatın devamlılığı için ve enerji üretimi için gerekli bir element olan oksijen, enerji üretimi için kullanıldığında reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Vücudun oksijeni kullanımı sırasında mitokondri tarafından sürekli üretilir ve serbest radikallerin oluşmasına sebep olur. Serbest radikallerin oluşması sonucu lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında değişiklikler oluşur [77]. Dış orbitalinde bir yada birden fazla sübstitüe (eşleşmemiş) elektronlar içeren atomlar, atom grubu veya moleküller serbest radikaller olarak tanımlanır [78]. Eşleşmemiş elektronları sayesinde diğer maddelerle rahatlıkla reaksiyona girerler. Çift elektron bulunduran atomlar ve elektronlar ise kararlı yapıda oldukları için diğer moleküllerle kolayca reaksiyona girmeleri serbest radikaller kadar yüksek değildir. Eşlenmemiş elektronu bulunmayan, kararlı yapıda bulunan ve diğer maddeler ile serbest radikallerden daha zayıf reaksiyona girebilen moleküller nonradikaller olarak tanımlanır. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklıdır. Oksijen kaynaklı serbest radikallere reaktif oksijen türleri (ROS), nitrojen kaynaklı serbest radikallere reaktif nitrojen türleri (RNS) denmektedir [79, 80].

2.5.1 Reaktif oksijen türleri

Moleküler oksijen (O_2) yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Bir radikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girerken, diğer serbest radikallerle hızlı reaksiyona girer [78]. Reaktif oksijen türleri normal oksijen metabolizması sırasında nadiren görülen radikallerdir. Bu radikaller,

proteinlere ve DNA'ya zarar veren kanser ve kardiyovasküler hastalıklara sebep olur [81]. Reaktif oksijen türleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Reaktif oksijen türleri (ROS) [82].

Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit	Hidrojen peroksit
Hidroksil	Hipokloröz asit
Peroksil	Hipobromöz asit
Alkoksil	Singlet oksijen
Hidroperoksil	Ozon
Lipidperoksil	

Süperoksit Anyon Radikali:

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), bir elektron alarak moleküler oksijenin (O_2) indirgenmesi sonucu oluşur [83]. Zayıf bir oksidandır ancak milisaniye yarı ömre sahip güçlü bir indirgendir [84].

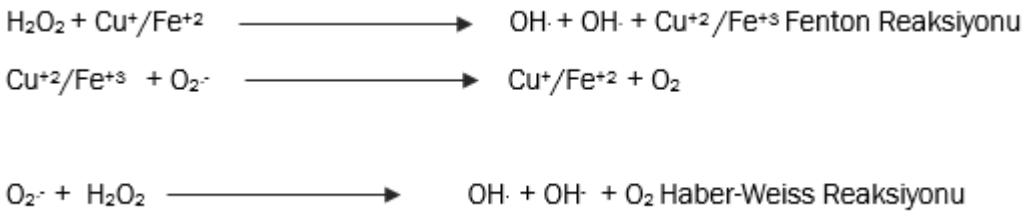
Hidroksil Radikali:

Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksidin geçiş metalleri reaksiyona girmesi, suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması, peroksinitrit radikalinin bozulması, UV ışınları tarafından oluşturulan H_2O_2 içindeki O-O bağının homolitik fisyonu gibi farklı şekillerde açığa çıkar. Şeker, amino asit, fosfolipid, DNA ve organik asit gibi birçok molekülle hızlı reaksiyona giren hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), oldukça reaktif bir oksidan radikalidir [85, 86].

Hidrojen Peroksit:

Hidrojen peroksit, eşleşmemiş bir elektron olmadığı için serbest bir radikal değildir ancak serbest oksijen radikalleri üretme potansiyeli nedeniyle serbest radikal olarak kabul edilir. Çünkü, Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu ve süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet -}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini ($OH^{\bullet}$) oluşturur [55]. Ayrıca hidrojen peroksidin diğer önemli fonksiyonu da hücre içi sinyal molekülü

rolünü yerine getirmektir [87]. Haber Weiss ve Fenton reaksiyonu Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9: Haber Weiss ve Fenton reaksiyonu [88].

2.5.2 Reaktif nitrojen türleri

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, serbest radikallerin biyokimyasının genel kurallarında hızlı bir değişikliğe yol açmıştır. Bu çalışmalar, reaktif olmayan ve kısa ömürlü olmayan serbest radikallerin de var olduğunu ortaya koymuştur. Çok reaktif olmayan ve önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olan nitrik oksittir. Reaktif oksijen türleri gibi reaktif nitrojen türleri, biyolojik ortamda serbest radikaller tarafından daha stabil türlerin oluşumu sonucunda da ortaya çıkabilir [55]. Reaktif nitrojen türleri Tablo 2.2'de sunulmuştur.

Tablo 2.2: Reaktif nitrojen türleri (RNS) [82].

Radikaller	Nonradikaller
Nitrik oksit	Nitrik asit
Nitrojen dioksit	Nitrojen dioksit
	Nitrosil katyonu
	Dinitrojen trioksid
	Peroksinitrit
	Nitronyum katyonu
	Nitril klorid
	Alkil peroksinitrit

Nitrojen oksit:

Makrofajlardan salınan nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentezi (iNOS) ile L arginin'den sentezlenen bir moleküldür. Serbest oksijen radikalleri bir araya geldiğinde, peroksinitrit radikaline dönüşür. NO, konak immün sistemindeki bakteri, mantar, virüs ve parazit gibi patojenlere karşı önemli bir aracıdır. Ayrıca NO, örneğin nörotoksisite, vazodilatasyon ve nörotransmisyon gibi biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Ancak, NO'nun gereğinden fazla üretilmesi, doku hasarına ve çeşitli hastalıklara neden olur [89, 90].

Peroksinitrin:

Peroksinitrit, nitrik oksit ve süperoksit birleşmesi sonucu oluşan bir radikaldir. Fizyolojik koşullar altında stabil değildir. Peroksinitrit, tiyollerle reaksiyona girerek tiyil radikallerini oluşturur ve tiyol oksidasyonuna neden olur. Tüm büyük biyomoleküllerle (protein, lipit, DNA) reaksiyona girerek hasara neden olur [91].

2.5.3 Serbest radikallerin doku ve hücrelere etkileri

2.5.3.1 Serbest radikallerin lipidlere etkisi

Biyomembranlar ve hücre içi organeller, membran fosfolipitlerin doymamış yağ asitleri nedeniyle oksidatif saldırılar için kolay hedef olabilirler. Reaktif oksijen radikalleri lipoprotein oksidasyonuna, özellikle LDL'ye neden olabilir [92]. Çoklu doymamış lipitlerin otoksidasyon işlemleri, birçok nedenden dolayı başlayabilen radikal bir zincirleme reaksiyonu içerir. Ayrıca lipooksijenaz enzimi de oksidasyonun başlamasına sebep olabilir [43]. Membran hasarı meydana geldiğinde, hücredeki temel metabolitler hücrenin dışına çıkar. Ayrıca, protein sentezi için önemli bir etkin madde olan Ca (II), hücrede hızla artar ve hücre ölümüne neden olur [93].

2.5.3.2 Serbest radikallerin proteinlere etkisi

Amino asitler, genellikle karboksil ve amino gruplarından dolayı lipitlerden daha fazla oksitlenme eğilimindedir. Bu moleküller, yan zincirlerde oksidatif transformasyona uğrayacak şekilde indirgenmiş karbon atomları içerir. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein içeren doymamış bağlar ve kükürt gibi amino asitlere sahip proteinler, serbest radikallerden kolayca etkilenir. Protein hasarından sonra, enzim aktivitesinin azalması, sitoliz ve hatta hücre ölümü meydana gelebilir. Birçok

araştırma, Parkinson, Alzheimer, diyabet, böbrek tümörü oluşumu ve romatizmal eklem iltihabı gibi pek çok hastalığın protein zincirlerindeki karbonil gruplarında meydana gelen artışla ilişkili olduğunu göstermektedir [94, 95].

2.5.3.3 Serbest radikallerin DNA'ya etkisi

DNA zincirindeki oksidatif hasarın ana hedefi pürin, pirimidin bazları ve şeker yapısıdır. Oksidatif hasar, zincirin bütünlüğünü bozarken, şeker hasarı ipliklerde kırılmalara neden olur. Güçlü bir reaktif oksijen türü olan $OH^{\bullet}$ radikali, DNA bazının çift bağları ile reaksiyona girerek DNA'ya zarar verir. Hücredeki yüksek miktarda reaktif oksijen türü, transkripsiyon faktörlerini ve ilgili genleri aktive eder ve DNA hasarını artırarak kanser oluşumunu hızlandırır [96].

2.5.3.4 Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi

Başlangıçta, hidrojen atomları C-H bağlarından çıkarılır ve karbonhidratların radikal oksidasyonunda α-hidroksialkil radikalleri oluşur. Bu radikaller asit ve baz katalize reaksiyonlarda C-OH bağları ile reaksiyona girerek, glikozidik bağların parçalanmasına ve O_2 ile peroksil radikallerinin oluşmasına neden olur [97].

2.5.4 Antioksidanlar ve savunma mekanizmaları

Serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ya da indirgeyen ve zararlı etkilerini engelleyerek meydana gelebilecek oksidatif hasarları ortadan kaldırmaya çalışan bileşikler antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar alt tabakaların, oksitlenebilir alt tabakalara kıyasla, vücutta veya gıdada düşük konsantrasyonlarda oksidasyonunu önemli ölçüde inhibe eder veya önler [98]. Antioksidanlar, yaşlanma ve dejeneratif hastalıklardan sorumlu reaktif oksijen türlerinde biyolojik bileşenlerin uyarılması ile ilişkili olduğundan daha çok dikkat çekmeye başlamıştır. Yaşlanma, kanser, ateroskleroz ve diğer ciddi hastalıkların DNA, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve hücre zarının maruz kaldığı oksidatif hasar ile doğru orantılı olduğu kanıtlanmıştır [99]. Tüm bu nedenlerden dolayı son yıllarda, sağlık otoritelerinin antioksidanlara olan ilgisi artmıştır. Günümüzde antioksidanların, reaktif nitrojen türleri ve reaktif oksijen türleri ve vücuttaki reaktif klor türleri ile ilişkili dejeneratif hastalıkları önlemeye yardımcı olduğu bilinmektedir.

Antioksidanlar 4 ayrı şekilde etki ederler [98].

1) **Toplayıcı etki:** Reaktif oksijen türlerinin enzimatik reaksiyon ile ya da doğrudan temizlenmesi.

2) **Bastırıcı etki:** Reaktif oksijen türlerinin supresyon yoluyla inhibe edilmesi.

3) **Kırıcı etki**: Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşumunun engellenmesi.

4) **Onarıcı etki:** Hasar sonrası hedef moleküllerin onarımı veya temizlenmesi.

2.5.5 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar doğal yada sentetik kaynaklı olabilir.

2.5.5.1 Sentetik kaynaklı antioksidanlar

Yağların oksidasyon mekanizmalarının anlaşılması ile birlikte oksidasyonu önlemek amacıyla antioksidan üretimi konusunda bir çok çalışma yapılmıştır. Bu amaçla sentetik antioksidanlar, doğal antioksidan formunda ve türevinde laboratuvarda sentezlenmeye başlanmıştır. Yapay antioksidanlar 1940'tan beri sentezlenmesine rağmen günümüzde gıdalarda yaygın olarak kullanılan antioksidanlar BHA (Butillenmiş hidroksi anisol), BHT (Butillenmiş hidroksi toluen), PG (Propil gallat) ve TBHQ (Tersiyer butil hidrokinon)'dur [100]. Gıdalarda bulunan sentetik antioksidanların görevi lipitlerin oksidasyonunu geciktirmek, gıdaların bozulmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmaktır [101].

Günümüzdeki çalışmaların amacı oksidatif süreci geciktirmek veya durdurmaktır. Sentetik antioksidanların insanlar üzerinde toksik ve kanserojen gibi olumsuz etkilerinin olması ve yan etkilerinin doğal antioksidanlara kıyasla fazla olması sebebiyle doğal kökenli antioksidanlara olan eğilim artmıştır [102-105].

2.5.5.2 Doğal kaynaklı antioksidanlar

Doğal antioksidanlar, organizmalar tarafından sentezlenen endojen ya da dışarıdan besinlerle alınan egzojen yapılar olarak tanımlanmaktadır [106]. İnsan vücudunda enzimatik antioksidan olan süperoksit dismutaz(SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-Transferaz(GST) ve katalaz(CAT) devamlı üretilmektedir. Bununla birlikte beslenme ile dışarıdan aldığımız antioksidanlarda antioksidan savunma mekanizmasının güçlenmesine ciddi katkılar sağlamaktadır [107, 108]. Bitkiler ve gıdalar, basit fenoller, fenil propanoidler, benzoik asit türevleri, flavonoidler, stilbenler, tanninler, lignanlar ve ligninler gibi geniş fenolik bileşik türevlerine

sahiptir. Doğal kaynaklı antioksidan özelliğine sahip fenolik bileşikler başlıca antioksidan kaynağıdır. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin ilk detaylı kinetik çalışması, 1947'de Boland ve Ten-Have tarafından gerçekleştirildi. Fenolik bileşikler antioksidan etkilerini 3 farklı şekilde gösterirler. Bunlar; serbest radikalleri bağlama, metallerle şelat oluşturma ve lipoksijenaz enzimini inaktive etme şeklinde meydana gelir [109-112]. Askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve skualen de diğer önemli doğal antioksidan maddelerdir [113]. Ayrıca en önemli kaynağı meyve ve sebzeler olan bitkisel antioksidanlar anormal hücre çoğalmalarını engeller ve oksidatif stresten dolayı zarar gören hücreleri koruyucu göreve sahiptirler [114]. Bununla birlikte meyve sebzelerdeki doğal antioksidanlar kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diğer bazı kronik rahatsızlıkların oluşumunu engellediği bilinmektedir. Meyve ve sebzelerde yüksek miktarda bulunan ve antioksidan aktivite gösteren fenolik bileşikler, C vitamini, E vitamini ve karotenoidler, oksidatif hasarla ilişkili bu hastalıklardan korunmada etkili bileşikler olarak öne çıkmaktadır [115, 116].

2.5.6 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

Antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde; DPPH serbest radikali giderme aktivitesi yöntemi [117], β-Karoten-Linoleik asit yöntemi [118], ORAC (Oksijen radikal absorbans kapasitesi) yöntemi [119], ABTS katyon radikal giderme aktivite yöntemi [107], süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi [120], FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme) yöntemi [121], TRAP (Toplam radikal tutma parametresi) yöntemi [122] ve CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi [123] en sık kullanılan yöntemlerden bazılarıdır.

2.6 *Prunus spinosa* L. Türü ile İlgili Literatür Araştırması

Etnobotanik kullanımı oldukça yaygın olan *Prunus spinosa* bitkisinin farklı aktiviteleri birçok çalışmada tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda potansiyel antioksidan, antikanser, antimikrobiyal ve antienflamatuvar aktivitelerine rastlanmıştır [124, 125]. Birçok yiyecek olarak kullanılan bitkilerin antioksidan özellikleri ile ilgili yapılan kapsamlı araştırmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte sindirim etkisini araştıran çalışmalar çok az sayıdadır. Bu tarz çalışmalar çok önemlidir. Çünkü yanlızca sindirimde bozulmayan antioksidanlar biyolojik işlevlerini yerine getirebilmektedir. Bu nedenle biyoyararlanımlarını anlamak için birkaç in vitro ve in vivo çalışma yapılmıştır [126]. Yapılan son araştırmalarla meyve ve sebzelerdeki toplam fenolik

madde içeriği, toplam flavonoid içeriği ve antosiyaninlere atfedilen fonksiyonel özelliklerinin in vitro gastrointestinal sindiriminden önce ve sonra antioksidan aktivitesi aydınlatılmıştır [127]. Costa ve ark. (2014) yaptığı araştırmada beslenmeyle alınan antioksidanların antienflamatuvar aktivite yoluyla bağırsak mukozası üzerinde doğrudan koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir [126].

Pinacho ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *P. spinosa* türünün dal, yaprak ve meyvelerinin toplam fenolik bileşikleri ve in vitro sindiriminin antioksidan kapasiteleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Diklorametan, etilasetat, etanol ve su çözücüleriyle hazırlanan 4 farklı ekstrelerde antioksidan aktvitesi tayini için DPHH radikal temizleme yöntemi kullanılmış ve ekstrelerin tümünde orta reaksiyon kinetiği gösterdiği bildirilmiştir. En yüksek antioksidan aktivite gösteren *P. spinosa* türünün dallarının olduğu bildirilmiştir. Toplam fenolik değerler 21,30 ± 0,60 mg/g ve 732,34 ± 6,41 mg/g arasında değişmektedir. Toplam fenolik madde içeriğine sahip en yüksek değerler etanol ve su ile hazırlanmış dal ekstrelerinde bulunduğu belirtilmiştir Meyvelerdeki toplam fenolik madde değerleri (359,11 ± 2,54 mg/g ve 327,02 ± 4,66 mg/g) arasında değişmektedir. Antioksidan ve fenolik bileşikler arasında yüksek bir kolerasyon olduğunu, bu nedenle fenolik bileşiklerin antioksidan olarak büyük bir rol oynadığı bildirilmiştir [125]. Bu çalışma meyve yanında özellikle daha önce çalışılmamış dal ve yaprakların antioksidan kapasitesini belirlemesi açısından önemlidir.

Velickovic ve arkadaşlarının (2013) *P. spinosa* türü ile ilgili yaptığı başka bir çalışmada, toplam fenolik, antosiyanin, flavonoid içeriği ve antioksidan aktivitesine bakılmıştır. Bu çalışmada türün taze meyveleri kullanılarak 5 farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstreler hazırlanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı Folin–Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Deneysel sonuçlar incelendiğinde toplam fenol içeriğinin önemli olduğu kanıtlandığı ifade edilmiştir. Değerler 15,33 mg GAE g^{-1} f.f.(su) ve 20,94 mg GAE g^{-1} f.f. (etanol–su 50/50, V/V) arasında değişmektedir. *P. spinosa* taze meyve ekstrelerinin rengi antosiyanin içeriğinden kaynaklanmaktadır. Antosiyanin miktarı pH diferansiyel yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Antosiyanin içeriği etanol ekstresinde 0,112 mg syanidin 3-glukoz g^{-1} ve metanol-su 50/50, V/V ekstresinde 0,265 mg syanidin 3-glukoz g^{-1} olarak hesaplanmıştır. Toplam flavonoid madde miktarına alüminyum klorür kolorimetrik yöntem kullanılarak bakılmıştır. İncelenen ekstrelerdeki toplam flavonoid içeriği düşük bulunduğu belirtilmiştir.

Flavonoid içeriği su ekstresinde 0,4 mg QE g^{-1} f.f. ve metanol ekstresinde 1,3 mg QE g^{-1} f.f. olarak hesaplanmıştır. Antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Test edilen tüm ekstrelerde % 32,05 ile % 89,10 arasında değişen bir DPPH radikallerine karşı güçlü temizleme aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada HPLC-DAD analiz yöntemi kullanılarak, etanol, etanol-su (1:1) ve su ile hazırlanmış ekstrelerdeki bileşikler belirlenmiştir. HPLC analizi ile fenolik asitler (neoklorojenik ve kafeik asitler), flavonoidler (kersetin ve mirisetin) ve antosiyaninler (siyanidin-3-O-glikozit, siyanidin-3-O-rutinosid, peonidin-3-O-glikozit) bileşikleri belirlenmiştir. Su ekstresinde sadece antosiyaninler bulunurken, etanol ve etanol-su ekstrelerinde fenolik asit ve flavonoidler belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite inhibisyon bölgesinin ölçülmesiyle analiz sonucunda *Bacillus* ATTCC 6633 dışında test edilen tüm mikroorganizmalara karşı *P. spinosa* türünün antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir [128].

Petkovsek ve arkadaşları (2016) tümü geleneksel kullanımı olan Avrupa'da toplanan 4 yabani *Prunus* türlerinin (*P. padus* L., *P. serotina* Ehrh., *P. avium* (L.) L. *ve P. spinosa*) meyvelerindeki şekerler, organik asitler, karotenoidler ve fenolik bileşikleri analiz etmişlerdir. Ayrıca fonksiyonel besin olarak potansiyel kullanımları antioksidan aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. *Prunus* türlerinin meyvelerindeki başlıca organik asitler, analiz edilen toplam organik asitlerin %80 ile %85'ini temsil eden malik ve sitrik asitler olduğu rapor edilmiştir. *Prunus* türlerindeki başlıca şeker bileşiklerin fruktoz ve glikoz olduğu ve analiz edilen bu şeker bileşiklerinin oranının *P. spinosa* türünde %55 olduğu kaydedilmiştir. *Prunus* türlerinin meyveleri klorofil, karotenoidler ve tokoferol açısından analiz edilmiş, toplam klorofilin ortalama içeriği analiz edilen türler arasında önemli ölçüde farklılık göstermiş, *P. spinosa* meyvesinde 29,90 mg/kg, toplam klorofil ölçüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca *P. spinosa* meyvesinin %14 karatenoid içerdiği bulunmuştur. Ortalama β-karoten içeriğinde *P. spinosa* türü 2,77 mg/kg FW değeri ile üçüncü sırada yer aldığı belirtilmiştir. Türde baskın karotenoid lutein olduğu rapor edilmiştir.

HPLC-MS analiz yöntemi kullanılarak meyvede analiz edilen fenolik bileşenlerin *P. spinosa* türünde %65 ile %70'ni meyvenin siyah veya mor rengiyle ilişkili olan antosiyaninlerin temsil ettiği ve pelargonidin, siyanidin ve peonidin antosiyaninlerinin tespit edildiği bildirilmiştir. *P. spinosa* meyvesindeki siyanidin-3-rutinosid 623 mg/kg FW olarak en yüksek değer olarak hesaplanmıştır. *Prunus* türlerinde özellikle *P.*

spinosa türünde toplam antosiyanidin miktarının 2335 mg/kg FW değeri ile son derece yüksek olduğu belirtilmiştir. Türün toplam flavonol miktarı 278,57 mg/kg FW, toplam tanen miktarı 1846,80 mg/kg FW olarak hesaplanmıştır. *P. spinosa* türünün meyvesinde toplam tanen miktarı 1846,80 mg/kg FW olarak belirlenmiştir [129]. Tanen alımı bağırsak glukoz emilimini geciktirerek kan şekerini düşürdüğü için diyabette etkili olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle diyabet hastalarına tanen açısından zengin diyet önerilmektedir. Ayrıca tanenlerin antienflamatuvar etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [130].

Ferit Çelik ve arkadaşlarının (2017) yaptığı başka bir çalışmada Van yöresinde yetişen *P. spinosa, P. domestica, P. cerasifera* Ehrh. erik türlerinin toplam antioksidan kapasiteleri, fenolik bileşikleri, organik asit ve C vitamini içerikleri tespit edilmiştir. Fenolik bileşik analizi sonucunda baskın fenolik bileşiğin klorojenik asit olduğu ve en yüksek değerin *P. spinosa* türünde 12,985 mg/kg^{-1} olarak bulunduğu belirtilmiştir. Baskın organik asitin malik asit olduğu ve en yüksek değerinin *P. spinosa* türünde 1,245$g/100g^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Toplam antioksidan kapasitesi 1,021 $mmolTE/kg^{-1}$ ve C vitamini 25,492$mg/100g^{-1}$ en yüksek değerler *P. spinosa* türünde diğer iki türe göre antioksidan kapasitesi ve biyokimyasal içerik açısından daha yüksek değerler bulunmuştur. Antioksidan kapasitesi ve C vitamini içeriği arasında önemli pozitif kolerasyon bildirilmiştir [131].

Radovanovic ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir çalışmada Sırbistan'da *Cornus mas* L. (kızılcık), *Prunus spinosa* L. (çakal eriği) ve *Rubus fruticosus* L. (yabani böğürtlen) meyvelerinin antioksidan kapasiteleri ve mikrobiyal aktivitelerini değerlendirmiştir. *P. spinosa* türünde toplam fenolik madde miktarı 7959,90 mg/kg^{-1} olarak tespit edilmiştir. Analiz sonucunda *P. spinosa* türünde tespit edilen fenolik bileşiklerden kersetin-3-glikozit en yüksek değere sahiptir. *P. spinosa* türü 27,06 ml/g^{-1} IC_{50} değeri ile DPHH radikali üzerine yüksek temizleme etkisi göstermiştir. Test edilen bakteri suşları üzerinde *P. spinosa* türü yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir [132].

Marchelak ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada Orta ve Doğu Avrupa'da idrar yolu bozuklukları, iltihaplanma ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisine yardımcı olarak kullanılan *P. spinosa* türünün çiçek ekstrelerindeki biyoaktivite potansiyeli; fitokimyasal profilleme, İnflamatuvar enzim inhibisyonu ve in vitro oksidatif strese karşı koruyucu etkilerini araştırmıştır. Fitokimyasal profilleme

açısından türle ilgili yapılan en kapsamlı çalışma olarak literatüre geçmiştir. UHPLC-PDA-ESI-MS3 analiz yöntemi kullanılark 36 yeni olmak üzere toplam 57 bileşik tanımlanmıştır. Tanımlanan bileşiklerde, kaempferol baskın olduğu ve toplam aglikonların % 64,4-79,7'sini oluşturduğu bildirilmiştir. Kersetin ve izorhamnetin içeriklerinin çok daha düşük olduğu ve sırasıyla aglikonların toplamının % 18,8-30,9' unu ve % 1,6-4,7'sini oluşturduğu belirtilmiştir. Beş farklı ekstrede (metanol/su 7:3 v/v, dietil eter, etil asetat, n-butonol, su) toplam fenolik madde içerikleri ve toplam proantosiyanidin içerikleri Folin-Ciocalteu ve n-butanol-HCI yöntemiyle ölçülmüştür. Toplam fenolik madde değeri en yüksek etilasetat ekstresinde 584,07 mg/g, toplam flavonoid değeri en yüksek dietileter ekstresinde 490,63 mg/g, toplam antosiyanin değeri en yüksek n-butonol ekstresinde 66,77 mg/g olarak gözlemlenmiştir [133].

Rodriguez ve arkadaşları (2013), *Prunus spinosa* L. ve *Creataegus monogyna* Jacg. türlerinin 3 farklı yılda (2007, 2008, 2009) ve farklı iki bölgeden (Alan1, Alan2) toplanan meyvelerin C vitamini, fenolik asitler, flavoneller ve antosiyaninlerden oluşan toplam fenolik bileşik ve antioksidan aktivitesi (ABTS, FRAP, DPPH) açısından değerlendirmişlerdir. Aynı türden meyvelerin bileşiminde geniş değişkenlikler tespit edilmiştir. *P. spinosa* meyvelerinde C vitamini 5,14 mg/100g^{-1} 15,35 mg/100g^{-1} arasında değişkenlik göstermiştir. *P. spinosa* meyvesindeki toplam fenolik bileşik en yüksek 2008 yılında alan 1'den toplanmış meyvede 3825,93 mg/100g^{-1} gallik asit eş değeri olarak bulunmuştur. *P. spinosa* ve *C. monogyna* türleri C vitamini ve fenolik bileşik açısından kıyaslandığında; *P. spinosa* meyvelerinin *C. monogyna* türüne göre daha fazla fenolik bileşik, daha az C vitamini içerdiği bildirilmiştir. Antioksidan aktivite değerleri açısından değerlendirildiğinde her iki türde de benzer sonuçlar bulunmuştur [10].

Karakaş ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada *P. spinosa* metanol ekstresinin antioksidan aktivitesini ve kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri in vitro olarak araştırılmıştır. Glioblastoma multiform (GBM) beyin kanseri (LN229, U-87 ve T98G) ve pankreas kanseri (PANC-1 ve AsPC-1) hücre hatları kullanılmıştır. Hücre canlılığı deneyleri, biyolüminesans sistemi kullanılarak canlı hücrelerin yüzdesinin ve antioksidan aktivitelerinin, spektrofotometrik olarak ABTS ve DPPH radikalleri ile ölçülmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda *P. spinosa* meyvesinin metanol ekstresinde, ABTS ve DPPH aktivite testlerinde toplam fenolik içeriği 2548±18 mg GAE/100 g ve orta düzeyde antioksidan aktivite (0,1896±0,1143 ve

0,0729±0,0348) gösterdiği bildirilmiştir. Beyin ve pankreas kanseri hücre hatlarında, glioblastoma multiform (GBM) beyin kanseri hücrelerinde %50-63 arasındaki hücre canlılığı ile önemli derecede sitotoksik aktivitesi belirlenmiştir. *P. spinosa* meyvesi metanol ekstresinin önemli antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve glioblastoma beyin kanseri hücrelerinin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir [134].

Ayla ve arkadaşları (2017) *P. spinosa* meyvelerinin metanol ekstresiyle fareler üzerinde yara iyileşmesiyle ilgili yaptıkları çalışmada, 4 farklı grup oluşturulmuştur. Farelerin sırtında eksizyonel yara modeli oluşturularak *P. spinosa* ve madecassol 10 gün boyunca uygulanmıştır. Onuncu gün sonunda yara bölgeleri histolojik takip için alınarak, 4. günün ve 10. günün sonunda yara kontraksiyonunda ve yara yerinin reepitelizasyonunda ilaç ve madecassol grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmayla *P. spinosa* meyvelerinin yara iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir. *P. spinosa* meyvelerinin antienflamatuvar, antioksidan ve antibakteriyel etkisi ile, kollajen sentezini artırarak ve enflamatuvar hücre sayısını azaltarak yara iyileşmesinin tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir [12].

Guimaraes ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada *Arbutus unedo* L., *Prunus spinosa*, *Rosa canina* L. ve *Rosa micrantha* (Spach) Steud meyvelerinin fenolik bileşimi HPLC-DAD – ESI / MS analiz yöntemiyle incelenmiştir. *P spinosa* meyveleri fenolik asitlerde en yüksek konsantrasyonu 29,78 mg/100g kuru ağırlık ve en yüksek değere sahip bileşik olarak da 3-O-kafeoilkinik asit bulunmuştur. Flavonollerin toplam değeri 57,48 mg/100g, bunların arasında kersetin3-O-rutinosid 15,63 mg/100g çoğunlukta bulunan bileşiktir. Tüm meyvelerde siyanidin 3-O-glikozit bileşiği bulunmuştur. *P. spinosa* meyvesi, analiz edilen türler arasında daha karmaşık antosiyanin profiline sahip olduğu rapor edilmiştir. *P. spinosa* meyveleri antosiyaninler de dahil olmak üzere en yüksek fenolik asit ve flavonoid seviyelerine sahiptir. *P. spinosa* meyvelerinde flavonoller, flavonlar ve hiçbir flavan-3-ol tespit edilememiştir. Yapılan bu çalışmada halk arasında geleneksel olarak kullanılan yabani meyvelerin fenolik bileşiklerinin kimyasal karakterizasyonuna bir katkı sağlamıştır [135].

Meschini ve arkadaşları (2017) çalışmada *P. spinosa* meyvelerinin insan kanser

hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik (hücrenin kendi kendini öldürmesi) aktiviteleri araştırılmıştır. *P. spinosa* metanol-su (80:20) ile hazırlanmış meyve ekstrelerinin in vitro antikanser aktivite gösterdiği bulunmuştur [124].

Fraternale ve arkadaşları (2009) İtalya'da yabani olarak büyüyen *P. spinosa* türünün meyvesinden elde edilen taze meyve suyunun 5-lipoksigenase testi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ve oksijen radikali emme kapasitesi (ORAC) radikal süpürme aktivite yöntemleri kullanılarak in vitro antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. *P. spinosa* meyvelerindeki toplam fenolik madde içeriği 83,5±2,5 mg/g ve toplam antosyanin içeriği 55,1±,6 mg/g olarak bulunmuştur. 5-lipoksijenaz ve DPPH aktivite testlerinde, *P. spinosa* türünün taze meyve suyu, iyi antioksidan aktivite göstermiştir. *P. spinosa* meyve suyundaki siyanidin-3-rutinosid, peonidin-3-rutinosid ve syanidin-3-glikozit bileşiklerinin antioksidan özelliklerinde önemli bir rol oynamasının muhtemel olduğu ve antioksidan kapasitesinin kırmızı meyveleriyle ilişkilendirildiği kaydedilmiştir [11].

Şengül ve arkadaşlarının (2018) Artvin ilinde geleneksel olarak üretilen kuşburnu (*Rosa canina*), kızılcık (*Cornus mas*), çakal eriği (*Prunus spinosa*) ve Ahlat armudu (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) farklı marmelat çeşitlerinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerini, antioksidan aktivitelerini ve fenolik bileşik profillerini değerlendirdiği çalışmada; tüm marmelat örneklerinin toplam ve suda çözünür kurumadde içeriklerinin %55, su aktivitesi değerlerinin 0,79, toplam şeker içeriklerinin 47 g/100g'ın üzerinde olduğunu bulunmuştur. *P. spinosa* HMF (hidroksimetilfurfural) içeriği ise 975,20±3,03 mg/kg olarak tespit edilmiştir. İncelenen örneklerde gallik asit, kateşin, epikateşin, vanillin, klorojenik asit, kafeik asit, kumarik asit, p-kumarik asit, hesperidin, rutin, elajik asit ve kersetin bileşikleri farklı oranlarda tespit edilmiştir. Marmelat örneklerinden *P. spinosa* türünün toplam fenolik madde içeriği 70,78 µg/GAE/, DPPH radikal giderme aktivitesi (% 2,45±0,16) olarak tespit edilmiştir [136].

Stankovic ve arkadaşları (2019) tarafından, zengin biyoaktif bileşik kaynağı *P. spinosa* meyvelerinin farklı çözücüler (metanol, %70 (v/v) etanol, %45 (w/w) propilen glikol ve su) kullanılarak elde edilen ekstreler polifenolik profil, tirozinaz inhibe edici etki (TIA) ve antioksidan aktivitesi (DPPH, NOS) açısından değerlendirilmiştir. Antioksidan ve tirozinaz inhibe edici etki en yüksek %45 propilen glikol ekstresinde

gözlemlenmiştir. Propilen glikol ekstresinde toplam fenolik, toplam flavonoid, toplam tanen, toplam antosiyanin ve toplam proantosiyanin değerleri sırasıyla; 1,82 mgGAE /g^{-1}, 2,62 mg RE g^{-1}, % 0,23, 6,81 mg CE g^{-1} ve 413,06 mgCG/100g olarak tespit edilmiştir [137].

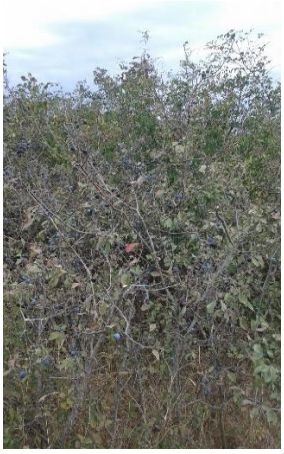
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Bitkisel materyal

Çalışma materyali olan *Prunus spinosa* bitkisinin meyveleri Silivri (İstanbul)'den Ekim 2018 tarihinde toplanmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3). Meyveler taze halde -20 ºC'de dondurulmuştur. Örnekler ekstraksiyon çalışmalarına başlayana kadar laboratuvarda -20 ºC'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Şekil 3.1: *Prunus spinosa* meyvelerinin toplandığı lokalite.



Şekil 3.2: *Prunus spinosa* türünün genel görünüşü.

Şekil 3.3: *Prunus spinosa* meyveleri.

3.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

- Etanol (C_2H_5OH): TEKKİM
- Folin Ciocalteu: MERCK
- % 7 lik Na_2CO_3 çözeltisi: TEKKİM
- %10 luk $AlCl_3$ çözeltisi: MERCK
- 1M CH_3COONH_4 çözeltisi: TEKKİM
- pH 1 tampon çözeltisi: ISOLAB
- pH 4.5 tampon çözeltisi hazırlama:
- Referans gallik asit çözeltisi: SIGMA-ALDRİCH
- Referans kersetin çözeltisi: SIGMA-ALDRICH
- 0,1 mM DPPH çözeltisi: SIGMA
- 7 mM ABTS çözeltisi: SIGMA
- BHT çözeltisi: SIGMA-ALDRICH
- Kontrol çözeltisi: TEKKİM

3.1.3 Kullanılan cihazlar

- Hassas terazi (SHIMADZU AUW220D)
- İnkübatör (HEİDOLPH)
- Döner buharlaştırıcı (HEİDOLPH Rotary Evaporatör Panel Hei-VAP 43 Precision ML P/N:569-40000-00-1)
- Liyafilizatör (SCANVAC)
- Su banyosu (SAMHEUNG ENERGY SH-WB-22GDN)

- Ultrasonik banyo (ULTRASONIC CLEANER SK3310HP)
- Vorteks (DRAGON MX-F)
- Otomatik pipetler (0,5-10 μL, 20–200 μL) (EPPENDORF)
- UV-Vis spektrofotometre (UV-VIS AGILENT TECHNOLOGIES CARY 60)
- Eliza cihazı (BioTek Epoch)
- Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (HOTPLATE and MAGNETİC STİRRER HS12-O6P)

3.2 Yöntem

3.2.1 Yüzey yanıt yöntemi

Bu çalışmada *Prunus spinosa* meyvesinde; ekstraksiyon değişkenlerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanin içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerine olan etkilerinin araştırılması ve optimum koşulların belirlenmesi için deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla bir istatistik programı olan Design-Expert-12 programı tercih edilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri bağımlı değişken üzerindeki istenmeyen etkenlerin etkisini ortadan kaldırmanın zorluğudur. Bu program, deney bağımsız değişkenleri ile oluşturulacak olası yöntemler arasında seçim yaparak deney sayısını azaltabilmekte ve böylece laboratuvar çalışmalarımızda çözücü tasarrufu ve kısa zamanda deneylerin yapılabilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır [138, 139]. Değişkenlerin etkisini araştırmak üzere üç değişkenli Optimal (Custom) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon için deneylerin saptanmasında 3 bağımsız değişkenden birincisi çözücünün konsantrasyonu (etanol/su); 0/100, 25/75, 50/50, 75/25, 100/0, ikincisi ekstraksiyon sıcaklığı; 22 ºC, 30 ºC, 40 ºC, üçüncüsü ekstraksiyonun süresi; 1, 2, 4 saat olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişken ve seviyeleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Bağımsız değişken ve seviyeleri.

Bağımsız Değişkenler	Seviyeler				
Çözücü (etanol/su)	0/100	25/75	50/50	75/25	100/0
Sıcaklık (ºC)	22	30	40		
Süre (saat)	1	2	4		

Değişkenlerin etkisini araştırmak üzere “Custom Optimal Response” 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımına göre 20 adet ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir ve Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

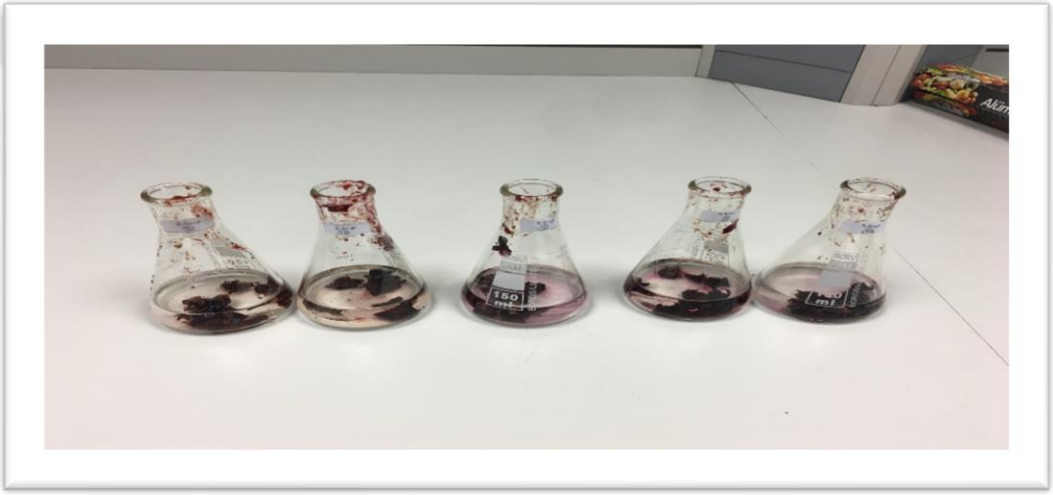
Tablo 3.2: Deney tasarımı.

Deney No:	Sıcaklık (ºC)	Süre	Çözücü(Etanol/Su)
1	22	1	0/100
2	22	1	100/0
3	22	2	25/75
4	22	2	75/25
5	22	4	50/50
6	3 0	2	50/50
7	3 0	2	50/50
8	30	2	50/50
9	30	2	50/50
10	30	2	0/100
11	30	4	0/100
12	30	4	50/50
13	30	4	100/0
14	40	1	50/50
15	40	1	50/50
16	40	2	0/100
17	40	2	0/100
18	40	2	100/0
19	40	4	50/50
20	40	4	100/0

3.2.2 Ekstraksiyon yöntemi

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarlarında yapılmıştır. *P. spinosa* meyvesinden ekstrelerin hazırlanmasında çözücü olarak etanol, etanol/su ve su kullanılmıştır. Yüzey yanıt yöntemine göre belirlenen 20 farklı ekstraksiyon yönteminin her biri 3 tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Böylece analizler için toplamda 60 adet ekstre elde edilmiştir. Ekstrelerde meyve ile çözücü oranı 5g/50ml (1:10, w/v) olarak belirlenmiştir. Her ekstre çalkalamalı inkübatör kullanılarak deney tasarım şartlarına uygun olarak hazırlanmıştır. Deney tasarımı ile belirlenen ekstraksiyon yöntemleri düşük sıcaklıktan (22 ºC) yüksek sıcaklığa (40 ºC) ve her sıcaklık kademesinde de en düşük süreden (1 saat) en yüksek süreye (4 saat) göre 1’den 20’ye kadar numaralandırılmıştır (Tablo 3.2). Her ekstre 3 tekrarlı hazırlandığı için ekstre tekrarını belirtmek için 1-1, 1-2, 1-3 şeklinde kodlamalar yapılmıştır.

Etanol Ekstreleri (Deney No: 2, 10, 13, 18, 20): Dondurulmuş olarak saklanan meyveler bıçak yardımıyla çok küçük parçalara ayrılmıştır. 5 mg örnek hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine 50 ml etanol eklenmiştir. Planlanan deney şartları dahilinde çalkalamalı inkübatörda bekletilmiştir. Ekstre süresi tamamlanınca örnekler hemen filtre kağıdı kullanılarak süzülmüştür. Süzüntüdeki etanol 40 °C'de vakum altında döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmıştır. Ekstre tamamen kuruması için çeker ocakta 1-3 gün bekletilmiştir. Kuruduktan sonra tüm ekstreler analizler yapılana kadar +4 ºC'de muhafaza edilmiştir. Etanol ekstrelerinin hazırlanması Şekil 3.4'de, etanol ekstrelerin inkübatörde bekletilmesi Şekil 3.5'de ve ekstrelerin süzülmesi Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Etanol ekstrelerinin hazırlanması.

Şekil 3.5: Ekstrelerin çalkalamalı inkübatörde bekletilmesi.

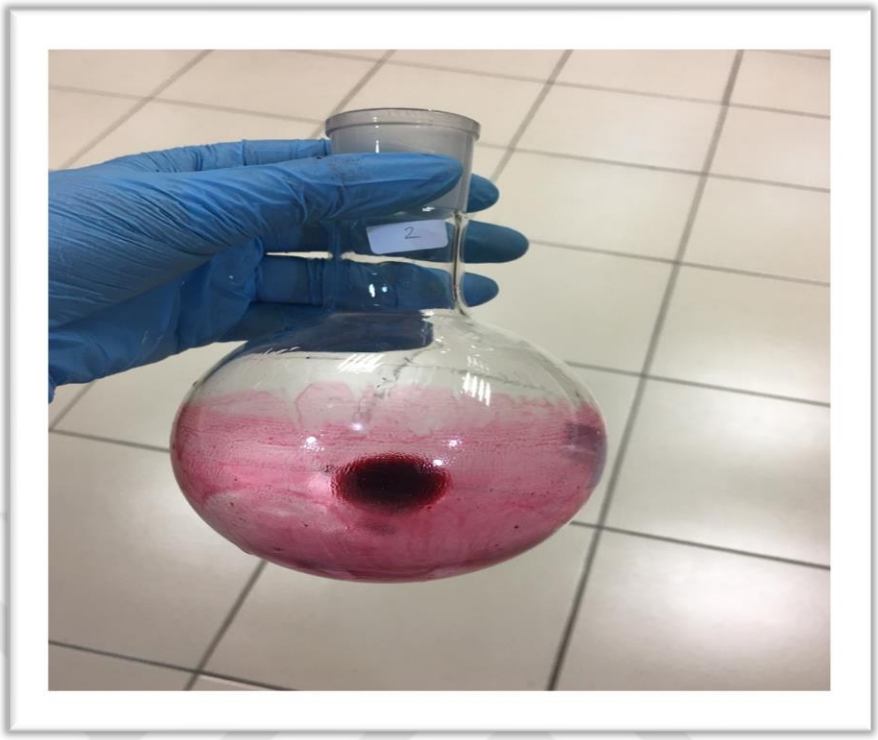
Şekil 3.6: Ekstrelerin süzülmesi.

Su Ekstreleri (Deney No: 1, 11, 16, 17): Dondurulmuş olarak saklanan meyveler bıçak yardımıyla çok küçük parçalara ayrılmıştır. 5 mg örnek hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine 50 ml distile su eklenmiştir. Planlanan deney şartları dahilinde çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Ekstre süresi tamamlanınca örnekler hemen filtre kağıdı kullanılarak süzülmüştür. Süzme sonunda elde edilen örnekler -80 ºC'de dondurulmuştur. Dondurulan örnekler liyofilizatörde 96 saat, 04 mbar; -50 °C'de tutularak kurutulmuştur. Kuruduktan sonra tüm ekstreler analizler yapılana kadar +4 ºC'de muhafaza edilmiştir. Su ekstrelerinin liyafilizatörde kurutulması Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

Şekil 3.7: Su ekstrelerinin liyafilizatörde kurutulması.

Etanol/Su Ekstreleri (Deney No: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 15, 19): Dondurulmuş olarak saklanan meyveler bıçak yardımıyla çok küçük parçalara ayrılmıştır. 5 mg örnek hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine 50 ml etanol eklenmiştir. Planlanan deney şartları dahilinde çalkalamalı inkübatörda bekletilmiştir. Ekstre süresi tamamlanınca örnekler hemen filtre kağıdı kullanılarak süzülmüştür. Ekstre tamamen kuruması için çeker ocakta 1-3 gün bekletilmiştir. Daha sonra -80 °C'de dondurulmuştur. Dondurulan örnekler liyofilizatörde 96 saat, 04 mbar; -50 °C'de tutularak kurutulmuştur. Kuruduktan sonra tüm ekstreler analizler yapılana kadar +4 ºC'de muhafaza edilmiştir. Etanolün döner buharlaştırıdan uzaklaştırılması Şekil 3.8'de ve elde edilen kuru ekstre Şekil 3.9'da gösterilmiştir.

Şekil 3.8: Etanolün döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılması.



Şekil 3.9: Kuru ekstre.

3.2.3 Toplam fenolik madde tayini

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Merkezi laboratuvarlarında yapılmıştır. Elde edilen 3 tekrarlı 20 adet *Prunus spinosa* meyve ekstrelerinde toplam fenolik madde miktar tayininde Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır [140]. Folin-Ciocalteu Yönteminde, Folin-Ciocalteu reaktifi sayesinde renk yoğunluğu oluşmaktadır. Bu renk yoğunluğunun görünür bölgedeki absorbans ölçümüne dayanan bir yöntemdir [4, 140].

3.2.3.1 Folin-Ciocalteu yöntemi

10 mg kuru ekstre üzerine 2,5 ml saf su ilave edilerek numune çözeltileri hazırlanmıştır. Folin-Ciocalteu yönteminde modifikasyonlar yapılmıştır. 96 kuyucuklu platelere 100 µl distile su konulmuştur. Daha sonra 8 µl hazırlanan numune ve 8 µl Folin Ciocalteu Reaktifi (FCR) sulandırılmadan ilave edilmiştir. 5 dakika bekletildikten sonra 80 µl %7'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) ilave edilmiştir. 90 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiştir. Absorbans değerleri Eliza cihazında 725 nm'de ölçülmüştür.

Çalışmada, standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Kalibrasyon aralığı belirlemek için 1000 ppm'lik gallik asit stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 60, 80 ve 100 mg/l) çözeltiler hazırlanmıştır. 725 nm'de 3 tekrarlı absorbans ölçümleri yapılmış ve konsantrasyona karşılık bulunan ortalama absorbans değerleri ile standart eğrisi çizilmiştir. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit miktarları standart grafik denklemi kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak mg/g cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.4 Toplam flavonoid tayini

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Merkezi laboratuvarlarında yapılmıştır. Elde edilen 3 tekrarlı 20 adet *Prunus spinosa* meyve ekstrelerinde toplam flavonoid miktarı alüminyum klorür kolorimetrik yöntem ile belirlenmiştir [141]. Yöntem alüminyum klorür ($AlCl_3$)'ün C-4 keto grupları ve flavonollerin C-3 veya C-5 hidroksil grubu ile kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır [141].

3.2.4.1 Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi

10 mg kuru ekstre üzerine 2,5 ml saf su ilave edilerek numune çözeltileri hazırlanmıştır. Alüminyum klorür kolorimetrik yöntem üzerinde modifikasyonlar yapılmıştır. 96 kuyucuklu platelere 134 µl distile su konulmuştur. Daha sonra sırasıyla 20 µl hazırlanan numune, 6 µl % 10'luk alüminyum klorür ($AlCl_3$) ve 40 µl 1M amonyum asetat (CH_3COONH_4) ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiştir. Absorbans değerleri Eliza cihazında 425 nm'de ölçülmüştür. Çalışmada, standart flavonoid bileşik olarak kersetin kullanılmıştır. 1000 ppm'lik kersetin stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 60, 80 ve 100 mg/l) çözeltiler hazırlanmıştır. 425 nm'de 3 tekrarlı absorbans ölçümleri yapılmış ve konsantrasyona karşılık bulunan ortalama absorbans değerleri ile standart eğrisi oluşturulmuştur. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen kersetin miktarları standart grafik denklemi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar kersetin eşdeğeri olarak mg/g cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.5 Toplam antosiyanin tayini

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Fitoterapi Merkezi laboratuvarlarında yapılmıştır. Elde edilen 3 tekrarlı 20 adet *Prunus spinosa* meyve

ekstrelerinde antosiyanin miktar tayini pH diferansiyel yöntemi kullanılarak yapılmıştır [105].

3.2.5.1 pH diferansiyel yöntemi

600 mg kuru ekstre, 100 ml su ile seyreltilerek 15 dk sonikatörde bekletilmiştir. Hazırlanmış ana ekstreden 25 ml'lik 2 ayrı balon jojeye 1'er ml alınmıştır. 25 ml'ye kadar birine pH 1,0 diğerine pH 4,5 tampon çözeltileri ilave edilmiştir. Hazırlanan numunelerin absorbans değerleri UV-VİS spektrofotometresinde 510 nm ve 700 nm' de ölçülmüştür. Siyanidin-3-glikozit standart olarak alınmıştır. Antosiyanin sonuçları Siyanidin-3-glikozit cinsinden % w/w olarak hesaplanmıştır. Antosiyanin içeriği aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır (3.1,3.2).

$$A = [(A_{510nm} - A_{700nm})\ pH_{1,0} - (A_{510nm} - A_{700nm})\ pH_{4,5}] \quad (3.1)$$

$$\%\ \text{Antosiyanin} = A \times \frac{449{,}2 \times V}{26900 \times W} \quad (3.2)$$

% Antosiyanin hesaplanmasında kullanılan formüllerin birimleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: % Antosiyanin hesabındaki formülün birimleri.

A	Absorbans	A
V	Seyreltme Faktörü	ml
W	Örnek Ağırlığı	mg
449,2	ma Siyanidin-3-glikozit	gram/mol
26900	Ekstinksiyon Katsayısı	E

3.2.6 Antioksidan aktivite tayini

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarlarında yapılmıştır. Elde edilen 3 tekrarlı 20 adet *Prunus spinosa* meyve ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) ve ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal giderme yöntemi ile belirlenmiştir [142, 117, 143, 144].

3.2.6.1 DPPH yöntemi

Serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir [142, 117, 143, 144]. Ekstrelerden 4 farklı konsantrasyonda numune çözeltileri su ile hazırlanmış ve 96 kuyucuklu platelere sırasıyla 50, 25, 12,5, 6,25 µM'lik konsantrasyon olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra DPPH çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika süre ile inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Her absorbans, üçlü ölçümlerin ortalaması olarak alınmıştır. Kontrol çözücüsü olarak etil alkol ve standart bileşik olarak BHT kullanılmıştır. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Numunelerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirilmiştir. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (3.3). Sonuçlara göre IC_{50} hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{İnhibisyon} = 100 \times \frac{Akontrol - Anumune}{Akontrol} \qquad (3.3)$$

A: Absorbans

3.2.6.2 ABTS yöntemi

Maddelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlenmiştir [142, 117, 143]. 7 mM ABTS radikal çözeltisi, 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) ve $K_2S_2O_3$ ile hazırlanmış ve çözelti 24 saat boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Ekstrelerden 4 farklı konsantrasyonda numune çözeltileri su ile hazırlanmış ve 96 kuyucuklu platelere sırasıyla 50, 25, 12,5, 6,25 µM'lik konsantrasyon olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra $ABTS^+$ çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 734 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Her absorbans, üçlü ölçümlerin ortalaması olarak alınmıştır. Kontrol çözücüsü olarak etil alkol ve standart bileşik olarak BHT kullanılmıştır. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlara göre IC_{50} hesaplanmıştır.

3.2.6.3 İstatistiksel analizler

Design-Expert-12 programı kullanılarak değişkenler ile yanıt arasındaki etkileşimi saptamak için ANOVA varyans analizi uygulanmıştır. Tüm deneysel veriler için varyans (ANOVA) analizleri gerçekleştirilmiştir. Linear, kubik, kuartik ve kuadratik modeller analiz edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Elde Edilen Ekstrelerin Yüzde Verimlilik Değerleri

Prunus spinosa meyvesinden elde edilen ekstrelerin yüzde verimlilik değerleri hesaplamıştır. Birinci grup ekstrede en yüksek verim 3-1 numaralı ekstrede % 32,25 olarak hesaplanmıştır. 2. grup ekstrede en yüksek değer %23,90 olarak 16-2 numaralı ekstrede gözlemlenmiştir. 3. grup ekstresinin en yüksek verimi % 63,41 olarak hesaplanan 14-1 numaralı ekstrede gözlemlenmiştir. 3 tekrarlı yapılan deneylerde aynı şartlar altında hazırlanan ekstrelerdeki yüzde verimlilik değerlerinde beklenildiği gibi farklılıklar gözlemlenmiştir. 60 ekstreden elde edilen verimlilikler Tablo 4.1 ve ortalama verimler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Meyvede belirlenen yüzde verimlilik miktarları.

1.Grup	%Verimi	2.Grup	%Verimi	3.Grup	%Verimi
1-1	21,94	1-2	23,38	1-3	21,02
2-1	13,35	2-2	12,19	2-3	12,46
3-1	32,25	3-2	21,49	3-3	26,55
4-1	21,79	4-2	19,62	4-3	19,61
5-1	21,53	5-2	21,74	5-3	19,05
6-1	19,97	6-2	21,23	6-3	18,63
7-1	27,27	7-2	22,06	7-3	17,27
8-1	24,62	8-2	14,28	8-3	23,23
9-1	19,86	9-2	15,43	9-3	18,88
10-1	12,36	10-2	12,75	10-3	11,77
11-1	25,52	11-2	33,59	11-3	35,84
12-1	20,48	12-2	14,94	12-3	16,65
13-1	14,48	13-2	11,78	13-3	12,52
14-1	26,20	14-2	23,07	14-3	63,41
15-1	17,41	15-2	21,17	15-3	14,54
16-1	26,38	16-2	23,90	16-3	39,91
17-1	29,02	17-2	22,91	17-3	27,89
18-1	15,98	18-2	19,08	18-3	13,87
19-1	23,01	19-2	23,78	19-3	26,59
20-1	16,58	20-2	14,07	20-3	13,44

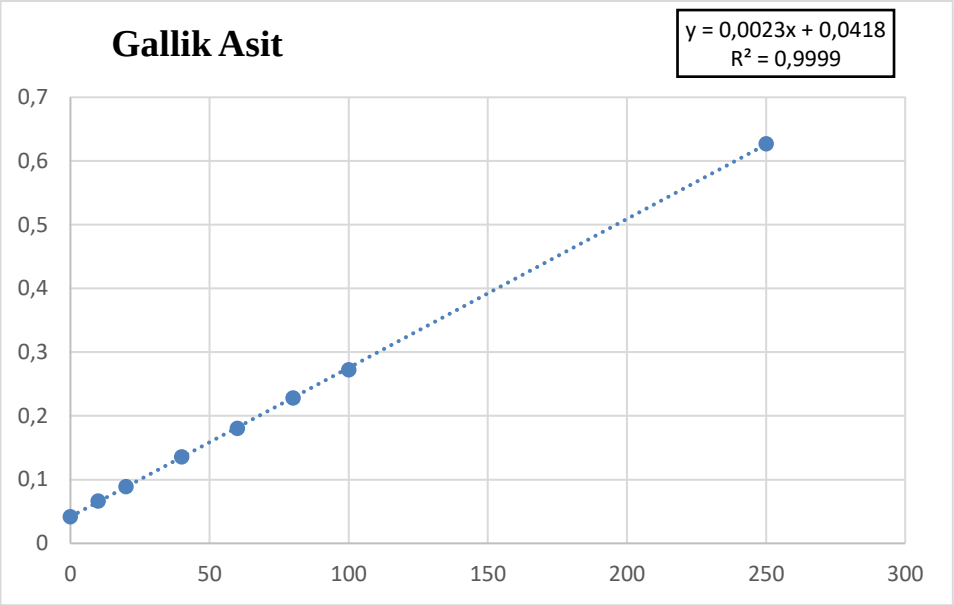
Ortalama verim hesaplamalarında yüzde verimlilik değerleri %12,67-%37,56 arasında değişmektedir. En yüksek verim 40 °C sıcaklık, etanol-su (1:1) konsantrasyon oranı ve 1 saat sürede hazırlanan14 numaralı ekstrede (Tablo 4.2) %37,56 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.2: Meyvede belirlenen ortalama yüzde verimlilik miktarları.

Deney No	%Verim
1	22,11
2	12,67
3	26,76
4	20,34
5	20,77
6	19,94
7	22,20
8	20,71
9	18,06
10	12,29
11	31,65
12	17,36
13	12,93
14	37,56
15	17,71
16	30,06
17	26,61
18	16,31
19	24,46
20	14,70

4.2 Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini Bulguları

Kalibrasyon aralığını belirlemek için fenolik bir bileşik olan gallik asit kullanılmıştır. 1000 ppm'lik gallik asit stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir çözelti için 725 nm'de 3 tekrarlı absorbans ölçümleri yapılmıştır. Ortalama değerleri üzerinden kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Standart grafik denklemi belirlenmiştir.

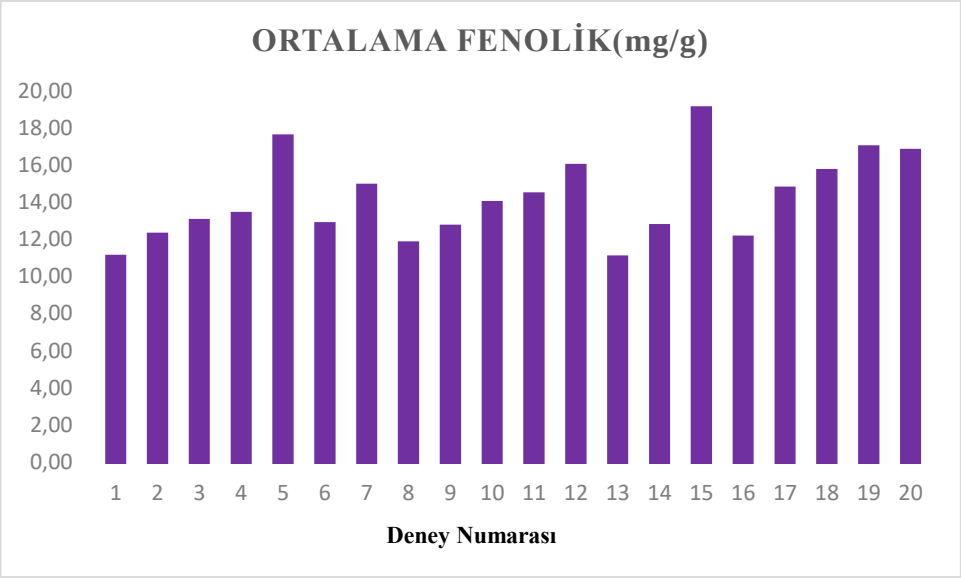


Şekil 4.1: Gallik asit kalibrasyon eğrisi.

Toplam fenolik madde miktarı tayini için hazırlanan örnekler üzerine yöntem doğrultusunda gerekli modifikasyonlar yapılmıştır. Plate ekimleri tamamlandıktan sonra Eliza cihazında 725 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kaydedilmiştir. Standart grafik denkleminde yerine konularak örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinden yola çıkılarak tespit edilen fenolik madde miktarları mg/g olarak hesaplanmıştır. Ortalama toplam fenolik madde değerleri Tablo 4.3'de ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.3: Meyvede belirlenen ortalama fenolik miktarları.

DeneyNo:	mg/g	Sıcaklık(ºC)	Süre(saat)	Etanol/Su
1	11,02	22	1	0
2	12,22	22	1	100
3	12,97	22	2	25
4	13,34	22	2	75
5	17,52	22	4	50
6	12,79	22	2	50
7	14,85	30	2	50
8	11,76	30	2	50
9	12,65	30	2	50
10	13,92	30	2	100
11	14,40	30	4	0
12	15,93	30	4	50
13	10,99	30	4	100
14	12,69	40	1	50
15	19,03	40	1	50
16	12,06	40	2	0
17	14,71	40	2	0
18	15,65	40	2	100
19	16,93	40	4	50
20	16,74	40	4	100



Şekil 4.2: Ortalama fenolik madde miktar grafiği.

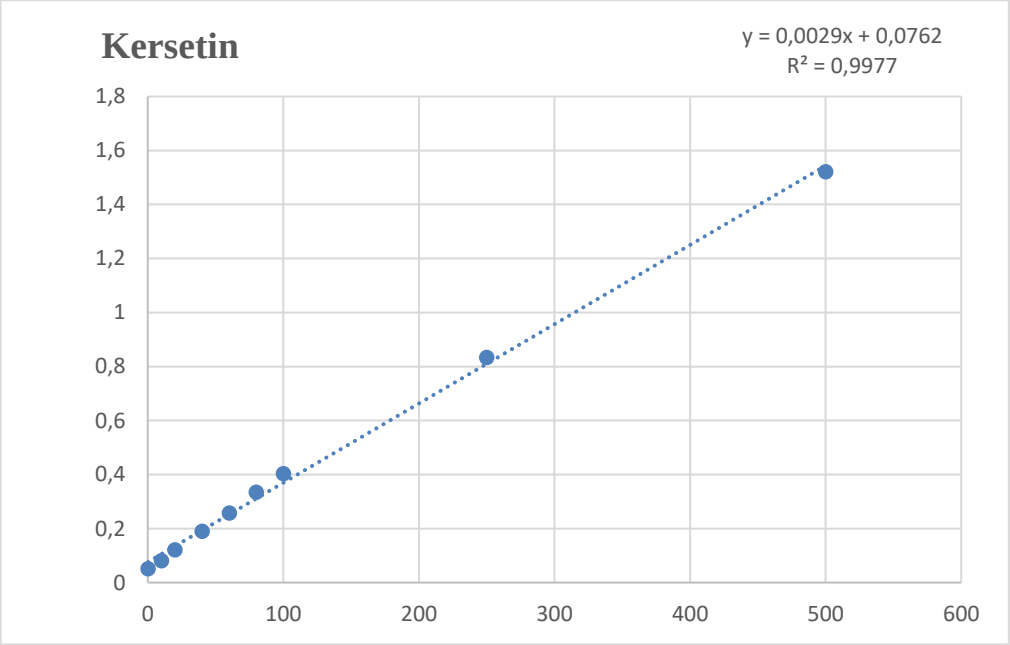
Prunus spinosa meyvesinin farklı çözücü sistemlerinde elde edilen toplam fenolik madde içeriği mg/g cinsinden tespit edilmiştir. Analiz edilen 3 tekrarlı 20 ekstrede (Tablo 3.2) toplam fenolik madde miktarı değerleri 11,02 mg/g-19,03 mg/g arasında

değişmektedir. *P. spinosa* meyvesinin H_2O çözücüsü ile hazırlanan ekstrelerinden (1-11-16-17) elde edilen toplam fenolik madde miktarları en yüksek değeri 30 ºC sıcaklıkta 4 saat süreyle hazırlanan 11 numaralı ekstrede 14,40 mg/g olarak belirlenmiştir. EtOH çözücüsü ile hazırlanan ekstrelerinde (2-10-13-18-20) elde edilen toplam fenolik madde miktarları en yüksek değeri 40 ºC sıcaklıkta 4 saat süreyle hazırlanan 20 numaralı ekstrede 16,74 mg/g olarak tespit edilmiştir. H_2O+EtOH (1:1) çözücüsü ile hazırlanan ekstrelerinden (5-6-7-8-9-12-14) elde edilen toplam fenolik madde miktarları en yüksek değeri 40 ºC sıcaklıkta 1 saat süreyle hazırlanan 15 numaralı ekstrede 19,03 mg/g olduğu görülmüştür. H_2O+EtOH (3:1) çözücüsü ile hazırlanan 3 numaralı ekstrede elde edilen fenolik madde miktarı 12,97 mg/g; ve H_2O+EtOH (1:3) çözücüsü ile hazırlanan 3 numaralı ekstrede elde edilen fenolik madde miktarı 13,34 mg/g olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 20 ekstrede toplam fenolik madde miktarının en yüksek değeri H_2O+EtOH (1:1) çözücüsü ile 40 ºC sıcaklıkta 1 saat süreyle hazırlanan 15 numaralı ekstrede 19,03 mg/g olduğu tespit edilmiştir. Bulunan sonuçları, *P. spinosa* meyvesinin literatürde bulunan mevcut çalışmalarla kıyasladığımızda Radovanic ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir çalışmada *P. spinosa* meyvelerinin toplam fenolik madde miktarını 7959 mg/kg olarak bildirmişlerdir [132]. Rodriguez ve arkadaşlarının (2014) yaptığı başka bir çalışmada toplam fenolik madde miktarını 2294,57 mg/100g olarak bildirmiştir [10]. Velickovic ve arkadaşlarının (2014) yaptığı başka bir çalışmada *P. spinosa* meyvelerindeki toplam fenolik madde miktarını etanol ile hazırlanmış ekstrede 1533 mg/g, etanol-su (1:1) ile hazırlanmış ekstrede 20,94 mg/g ve su ile hazırlanmış ekstrede 12,17 mg/g olarak bildirmiştir [128]. Bu tez kapsamında elde ettiğimiz değerler Velickovic ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmaya oldukça yakın olarak bulunmuştur (etanol: 17 mg/g, etanol-su (1:1): 19 mg/g ve su: 15 mg/g). Radovanic ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada 7959 mg/kg olarak bildirdiği toplam fenolik madde miktarının [132] çalışmamızda elde ettiğimiz en düşük değer olan 11,02 mg/g'dan daha düşük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte Pinacho ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmalarında türün meyvelerindeki toplam fenolik madde miktarının etanol ile hazırladıkları ekstrede 359,11 mg/g, su ile hazırladıkları ekstrede 327,02 mg/g olduğunu bildirmiştir [125]. Bu veriler bizim verilerimizden oldukça yüksektir. Marcelak ve arkadaşları (2017) çalışmalarında *P. spinosa* meyvelerindeki toplam fenolik madde miktarını etilasetat ekstresinde 584,07 mg/g olarak bildirmiştir. Su

ekstresinde ise toplam fenolik madde miktarı 64,6 mg/g olarak gözlemlenmiştir [133]. Tez kapsamında su ile hazırladığımız ekstrelerde en yüksek değeri 14,71 mg/g olarak 17 numaralı ekstrede belirlenmiştir. Marcelak ve arkadaşlarının değerlerinden oldukça düşüktür.

4.3 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini Bulguları

Kalibrasyon aralığını belirlemek için flavonoid bir bileşik olan kersetin standart olarak kullanılmıştır. 1000 ppm'lik kersetin stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir çözelti için 425 nm'de 3 tekrarlı absorbans ölçümleri yapılmıştır. Ortalama değerleri üzerinden oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.3'de verilmiştir. Standart grafik denklemi belirlenmiştir.

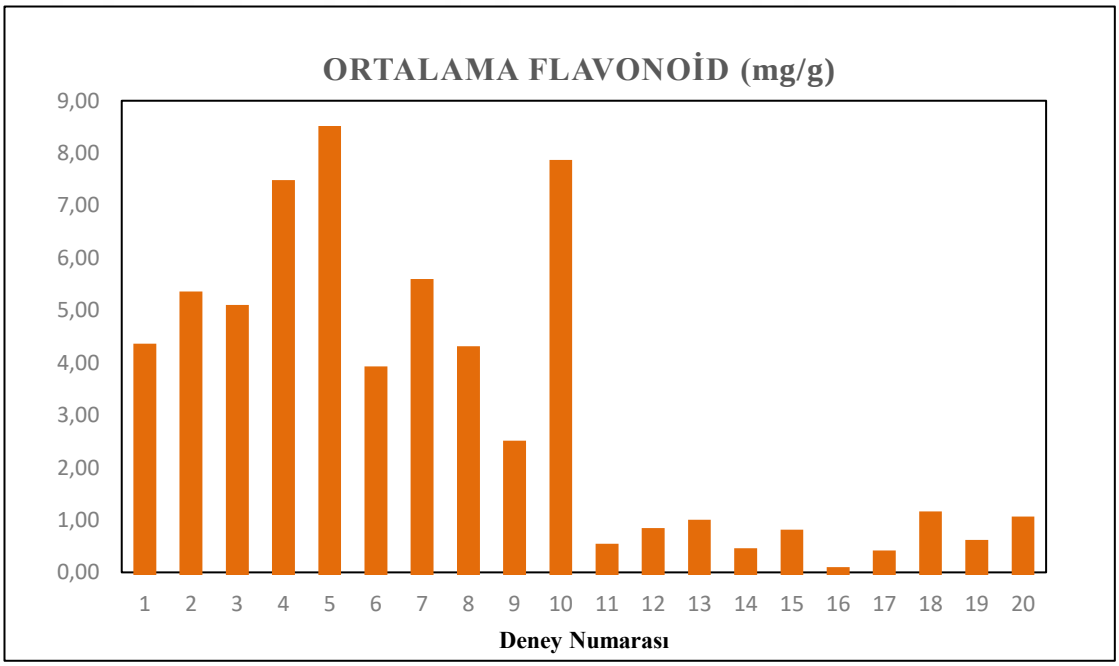


Şekil 4.3: Kersetin kalibrasyon eğrisi.

Toplam flavonoid madde miktarı tayini için hazırlanan örnekler üzerine yöntem doğrultusunda gerekli modifikasyonlar yapılmıştır. Plate ekimleri tamamlandıktan sonra Eliza cihazında 425 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kaydedilerek standart grafik denklemi ile her bir örneğin konsantrasyonu hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinden yola çıkılarak tespit edilen fenolik madde miktarları mg/g kersetin eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Ortalama flavonoid değerleri Tablo 4.4'de ve Şekil 4.4'de sunulmuştur.

Tablo 4.4: Meyvede belirlenen ortalama flavonoid miktarları.

Deney No	mg/g	Sıcaklık(ºC)	Süre(saat)	Etanol/Su
1	4,31	22	1	0
2	5,31	22	1	100
3	5,05	22	2	25
4	7,43	22	2	75
5	8,47	22	4	50
6	3,88	22	2	50
7	5,55	30	2	50
8	4,26	30	2	50
9	2,46	30	2	50
10	7,82	30	2	100
11	0,50	30	4	0
12	0,79	30	4	50
13	0,96	30	4	100
14	0,41	40	1	50
15	0,77	40	1	50
16	0,05	40	2	0
17	0,37	40	2	0
18	1,11	40	2	100
19	0,57	40	4	50
20	1,02	40	4	100



Şekil 4.4: Ortalama flavonoid madde miktarı grafiği.

Prunus spinosa dondurulmuş meyvesinin farklı çözücü sistemlerinde elde edilen toplam flavonoid madde içeriği mg/g cinsinden tespit edilmiştir. Analiz edilen 3

tekrarlı 20 ekstrede (Tablo 3.2) toplam flavonoid madde miktarı değerleri 8,47 mg/g-0,05 mg/g arasında değişmektedir. Meyvenin H_2O ile hazırlanan ekstrelerinden (1-11-16-17) elde edilen toplam flavonoid madde miktarları en yüksek değeri 22 ºC sıcaklıkta 1 saat süreyle hazırlanan 1 numaralı ekstrede 4,31 mg/g olarak tespit edilmiştir. EtOH çözücüsü ile hazırlanan ekstrelerinde (2-10-13-18-20) ise en yüksek değeri 30 ºC sıcaklıkta 2 saat süreyle hazırlanan 10 numaralı ekstrede 7,82 mg/g olarak bulunmuştur. H_2O+EtOH (1:1) çözücüsü ile hazırlanan ekstrelerinden (5-6-7-8-9-12-14) toplam flavonoid madde miktarları en yüksek değeri 22 ºC sıcaklıkta 4 saat süreyle hazırlanan 5 numaralı ekstrede 8,47 mg/g ve H_2O+EtOH (3:1) çözücüsü ile hazırlanan 3 numaralı ekstrede 5,05 mg/g olarak saptanmıştır. Bununla birlikte H_2O+EtOH (1:3) çözücüsü ile hazırlanan 4 numaralı ekstrede ise toplam flavonoid madde miktarının 7,43 olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan 20 ekstrede toplam flavonoid madde miktarının en yüksek değeri H_2O+EtOH (1:1) çözücüsü ile 22 ºC sıcaklıkta 4 saat süreyle hazırlanan 5 numaralı ekstrede 8,47 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

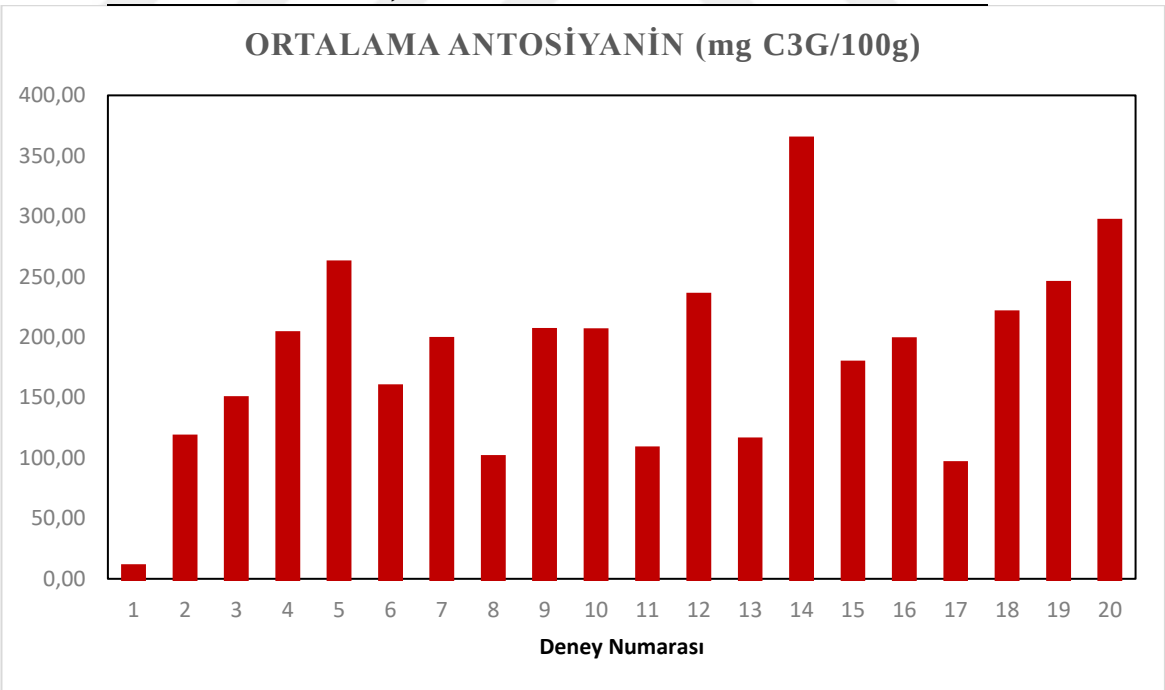
Bulunan verileri *P. spinosa* meyvesinin literatürde bulunan mevcut çalışmaları ile kıyasladığımızda oldukça benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir [133, 137].

4.4 Toplam Antosiyanin Madde Miktar Tayini Bulguları

Tooplam antosiyanin madde miktarı tayini için, ana ekstreye pH 1,0 ile pH 4,5 ilave edilmiştir. Hazırlanan örneklerde toplam antosiyanin madde miktarını belirlemek için UV-VIS spektrofotometresinde 510 nm'de ve 700 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar mg C3G/100 g cinsinden hesaplanmıştır. Ortalama antosiyanin değerleri Tablo 4.5 ve Şekil 4.5'te sunulmuştur.

Tablo 4.5: Meyvede belirlenen ortalama antosiyanin miktarları.

Deney No	mgC3G/100g	Sıcaklık(ºC)	Süre(saat)	Etanol/Su
1	9,77	22	1	0
2	117,23	22	1	100
3	149,01	22	2	25
4	202,71	22	2	75
5	261,32	22	4	50
6	158,76	22	2	50
7	197,93	30	2	50
8	100,16	30	2	50
9	205,22	30	2	50
10	205,16	30	2	100
11	107,47	30	4	0
12	234,50	30	4	50
13	114,78	30	4	100
14	363,83	40	1	50
15	178,30	40	1	50
16	197,78	40	2	0
17	95,26	40	2	0
18	219,84	40	2	100
19	244,30	40	4	50
20	295,56	40	4	100



Şekil 4.5: Ortalama antosiyanin madde miktarı grafiği.

Prunus spinosa meyvesinin farklı deney koşullarında hazırlanan ekstrelerindeki toplam antosiyanin madde içeriği mgC3G/100g cinsinden tespit edilmiştir. Analiz

edilen 3 tekrarlı 20 ekstrede (Tablo 3.2) toplam antosiyanin miktarı değerleri 9,77 mgC3G/100g-364 mgC3G/100g arasında değişmektedir. Türün meyvesinin H_2O ekstrelerinde (1-11-16-17) en yüksek toplam antosiyanin madde miktarı 40 ºC sıcaklıkta 2 saatte hazırlanan 16 numaralı ekstrede 197,78 mgC3G/100g olarak belirlenmiştir. EtOH çözücüsü ile hazırlanan ekstrelerden (2-10-13-18-20); 40 ºC'de 4 saatte hazırlanan 20 numaralı ekstrede toplam antosiyanin madde miktarı 295,56 mgC3G/100g olarak en yüksek değer olduğu tespit edilmiştir. H_2O+EtOH (1:1) çözücüsü ile hazırlanan ekstreler (5-6-7-8-9-12-14) arasında 363,83 mgC3G/100g değer ile en yüksek toplam antosiyanin madde miktarına sahip olan ekstrenin 40 ºC'de 1 saatte hazırlanan 14 numaralı ekstre olduğu görülmektedir. H_2O+EtOH (3:1) ile hazırlanan 3 numaralı ekstrede elde edilen toplam antosiyanin madde miktarı 149,01 mgC3G/100g; H_2O+EtOH (1:3) ile hazırlanan 4 numaralı ekstrede ise 202,71 mgC3G/100g olduğu tespit edilmiştir. Tüm ekstreler içinde toplam antosiyanin madde miktarının en yüksek değeri H_2O+EtOH(1:1) çözücüsü ile 40 ºC sıcaklıkta 1 saat süreyle hazırlanan 14 numaralı ekstrede 363,83 mgC3G/100g olduğu tespit edilmiştir. Bulunan sonuçları güvem meyvesinin literatürde bulunan mevcut çalışmalarıyla kıyasladığımızda Velickovic ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada meyvelerindeki toplam antosiyanin madde miktarı en yüksek 0,265 mgC3G/g metanol-su (1:1) ile hazırlanmış ekstrede bulunmuştur. Aynı çalışmada etanol-su (1:1) ekstresinde ise 0,238 mgC3G/g olarak bulunmuştur [128]. Başka bir çalışma olan Uzelac ve arkadaşlarının (2007) yaptığı araştırmada farklı bölgelerden toplanmış *P. spinosa* meyvelerinin toplam antosiyanin madde miktarını sırasıyla; 305,04 mgC3G/kg ve 497,43 mgC3G/kg olarak bulmuşlardır [145]. Pinacho ve arkadaşları (2015) meyvenin etanol ekstresinde toplam proantosiyanidin miktarını 165,73 mg/g, su ekstresinde ise 127,16 mg/g olarak bulmuştur [125]. Sonuçlarımız Pinacho ve arkadaşlarının (2015) ve Velikovic ve arkadaşlarının (2014) rapor ettiği değerler ile benzerlik göstermektedir.

4.5 Antioksidan Aktivite Tayininin Bulguları

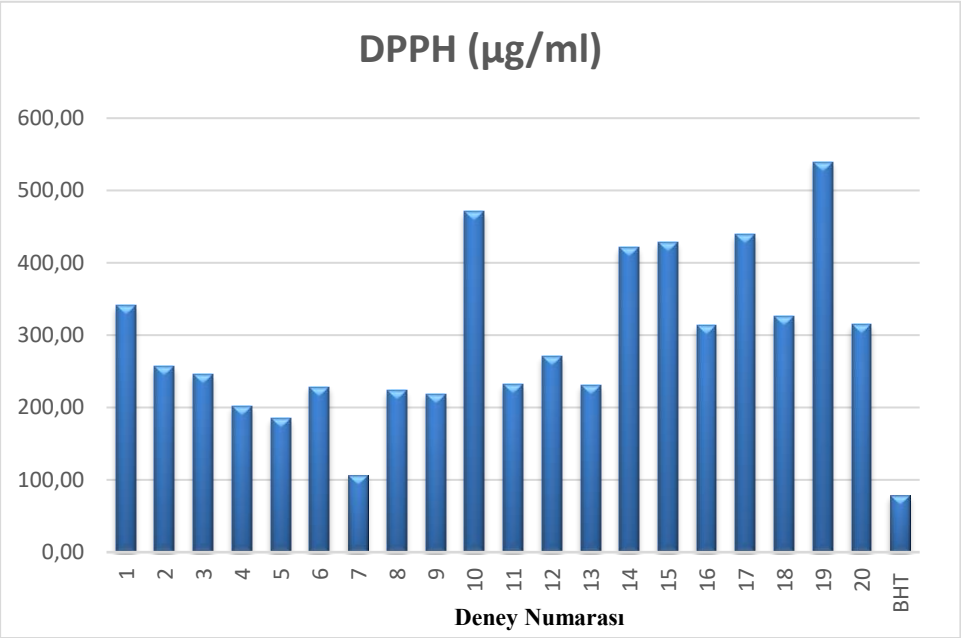
Meyve ekstrelerinin antioksidan aktivitesi, DPPH ve ABTS derişimlerinin başlangıçtaki değerlerinin % 50 azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC_{5O} değerleri ile verilmiştir. Düşük IC_{50} değeri antioksidan kapasitesinin oldukça güçlü olduğunu göstermektedir.

4.5.1 DPPH serbest radikal giderme bulguları

Prunus spinosa meyve ekstrelerindeki DPPH serbest radikali giderim aktivitesi BHT standart maddelerinin stok çözeltisi kullanılarak 4 farklı konsantrasyonda (10, 25, 50 ve 100 µg/ml) incelenmiştir. Çözeltilere kullanılan metotta gerekli ilaveler yapıldıktan sonra 517 nm'de Eliza cihazında absorbans ölçümleri yapılmıştır. Analizler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ortalama absorbans değerleri kullanılarak serbest radikal giderim aktivitesi hesaplanmıştır. Farklı konsantrasyonlar için hesaplanan sonuçlar IC_{50} cinsinden değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.6 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6:DPHH serbest radikal giderme IC_{50} sonuçları.

Deney Numarası	DPPH IC_{50}(µg/ml)
1	341,28
2	256,76
3	245,57
4	201,88
5	184,83
6	228,27
7	106,97
8	223,18
9	218,67
10	470,52
11	231,85
12	270,53
13	230,69
14	421,11
15	428,00
16	313,41
17	438,93
18	326,14
19	539,64
20	314,79
BHT	78,38



Şekil 4.6:DPPH serbest radikal giderme IC_{50} sonuçları grafiği.

Çalışmada standart olarak kullanılan olan BHT'nin IC_{50} değeri 78,38 µg/ml olarak belirlenmiştir. Standart ile karşılaştırıldığında en düşük antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın IC_{50} değeri 539,64 µg/ml olan 19 numaralı ekstrede, en yüksek antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın ise IC_{50} değeri 106,97 µg/ml olan 7 numaralı ekstrede olduğu belirlenmiştir.

Bulunan sonuçları *P. spinosa* meyvesinin literatürde bulunan mevcut çalışmalarla kıyasladığımızda Stankovic ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmalarında, DPPH antioksidan aktivite sonuçlarının IC_{50} değerleri bizim çalışmamızdaki IC_{50} değerleriyle benzerdir. DPPH aktivite sonuçları; metanol ekstresinde 525,28 µg/ml, etanol-su ekstresinde 262,94 µg/ml ve su ekstresinde 493,28 µg/ml olarak, FRAP aktivite sonuçları ise; metanol ekstresinde 242,75 µg/ml, etanol ekstresinde 229,36 µg/ml ve su ekstresinde 206,74 µg/ml olarak tespit edilmiştir [137]. Pinocho ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada ekstrelerin maksimum inhibisyona ulaşmak için ihtiyaç duydukları süreye bağlı olarak sınıflandırılmıştır (min15, min30, min45, min60, min90). Toplam antioksidan kapasitesi tüm reaksiyon süresi boyunca değişmiştir. Analiz edilen tüm ekstreler orta reaksiyon kinetiği gösterirken askorbik asit ve BHA sırasıyla hızlı ve yavaş kinetik reaksiyonlar göstermiştir. Aynı çalışmada *P. spinosa* meyvelerinin antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan IC_{50} değeri 38,53 µg/ml olarak yine etanol ekstresinde gözlemlenmiştir [125]. Uzelac ve arkadaşlarının

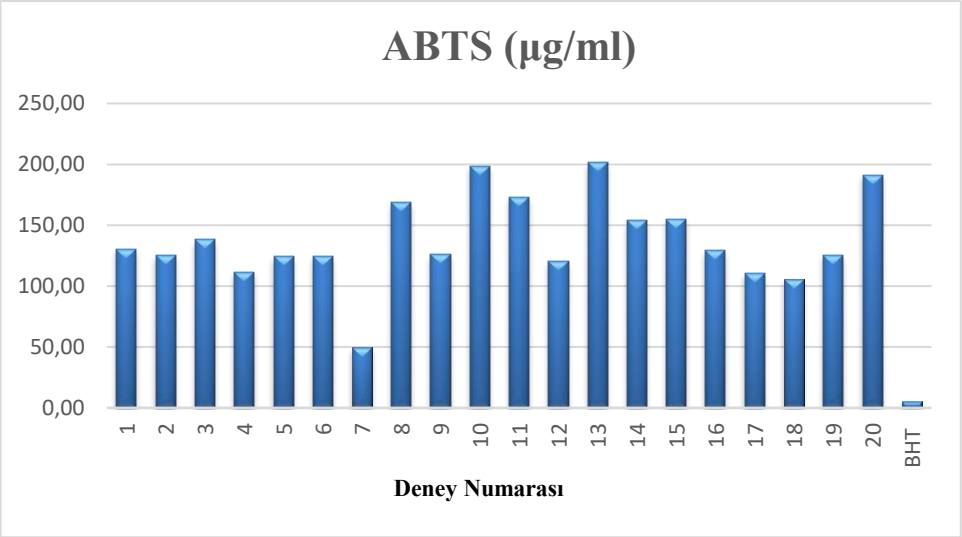
(2007) yaptığı çalışmada DPPH serbest radikal giderme aktivitesini 24,40 mmol trolox eşdeğeri/kg f.w. ve 28,15 mmol trolox eşdeğeri/kg f.w. olarak bulunmuştur [145]. Velickovic ve arkadaşları türün meyvelerindeki antioksidan etkilerini araştırmak için DPPH yöntemini kullanmışlardır. Test edilen tüm ekstrelerin (etanol, etanol-su, metanol, metanol-su, su) DPPH radikallerine karşı güçlü temizleme aktivitesi gösterdiğini ve sonuçlarının % 32,05 ile 89,10 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir [128]. Elde edilen değerler bizim bulduğumuz sonuçlarla karşılaştırıldığında biraz daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bunun sebebi DPPH yönteminde kullanılan DPPH veya araştırılan antioksidanların konsantrasyonlarındaki farklılıklara, kullanılan çözücülere, bekletme sürelerine ve DPPH'ın ya da antioksidanların ışığa veya havaya maruziyetine bağlılığından kaynaklanabilir [146].

4.5.2 ABTS serbest radikal giderme bulguları

Prunus spinosa meyve ekstrelerindeki ABTS serbest radikali giderim aktivitesi BHT standart maddelerinin stok çözeltisi kullanılarak 4 farklı konsantrasyonda (10, 25, 50 ve 100 µg/ml) incelenmiştir. Çözeltilere kullanılan metotta gerekli ilaveler yapıldıktan sonra 734 nm'de Eliza cihazında absorbans ölçümleri yapılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen ortalama absorbans değerleri kullanılarak serbest radikal giderim aktivitesi hesaplanmıştır. Farklı konsantrasyonlar için hesaplanan sonuçlar IC_{50} µg/ml cinsinden değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.7 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: ABTS serbest radikal giderme IC_{50} sonuçları.

Deney Numarası	ABTS IC_{50}(µg/ml)	Deney Numarası	ABTS IC_{50}(µg/ml)
1	130,52	11	173,12
2	125,73	12	120,74
3	138,28	13	201,59
4	111,57	14	153,83
5	124,36	15	155,19
6	124,68	16	129,14
7	49,34	17	110,51
8	168,99	18	105,92
9	126,17	19	125,40
10	198,64	20	191,42
BHT	5,10		



Şekil 4. 7: ABTS serbest radikal giderme IC_{50} sonuçları grafiği.

Çalışmada standart olarak kullanılan BHT'nin IC_{50} değeri 5,10 µg/ml olarak belirlenmiştir. Standart ile karşılaştırıldığında en düşük antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın IC_{50} değeri 201,59 µg/ml olan 13 numaralı ekstrede, en yüksek antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın ise IC_{50} değeri 49,34 µg/ml olan 7 numaralı ekstrede olduğu belirlenmiştir.

4.6 Yüzey Yanıt Metodoloji Sonuçları İle İdeal Ekstraksiyon Yönteminin Belirlenmesi

Belirlenen deney tasarımları ile hazırlanan *Prunus spinosa* meyve ekstrelerinde toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, antosiyanin miktarı, ABTS ve DPPH radikal giderme aktiviteleri yüzey yanıt yöntemi kapsamında Design-Expert-12 programında değerlendirilmiştir. ANOVA analizinde kareler toplamı, serbestlik derecesi, karelerin ortalaması, F değeri, p değeri ve R^2 değerleri belirlenmiştir. Ekstrede belirlenen bu değerlerde ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Böylece güvem meyvesinin etanol/su ekstrelerinin fenolik madde, flavonoid ve antioksidan aktivitelerinin optimum koşulları belirlenmiştir.

4.6.1 Toplam fenolik madde miktarının optimizasyonu

Toplam fenolik madde miktarı için varyans (ANOVA) analizleri gerçekleştirilmiştir. Linear, kubik, kuartik ve kuadratik modeller analiz edilmiştir. Analizler sonucunda

elde edilen verilerin anlamlı olabilmesi için modellerde p değerinin 0,05'ten düşük olması gerekmektedir. Bizim değerlerimiz 0,05'den yüksektir (Tablo 4.8). Bu modellerde istatistiksel açıdan anlamlı bir denklem kurulamadığı için karekök, doğal logaritma, 10 tabanlı logaritma, ters karekök, ters ve güç dönüşümleri ile analizler yapılmıştır. Fakat toplam fenolik madde miktarları için bu analizlerin sonucunda da istatistiksel açıdan anlamlı bir denklem kurulamamıştır. Bu sebep ile yüzey yanıt yönteminde toplam fenolik madde miktarı değerlendirilememiştir.

Tablo 4.8: Toplam fenolik madde miktarı için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri.

Model	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-Değeri	
Linear model	25,62	3	8,54	1,89	0,1712	anlamsız
Kuadratik model	60,00	9	6,67	1,77	0,1939	anlamsız
Kubik model	69,01	14	4,93	0,8578	0,6265	anlamsız
Kuartik model	69,01	14	4,93	0,8578	0,6265	anlamsız

.

4.6.2 Toplam flavonoid madde miktarının optimizasyonu

Ekstrelerdeki belirlenen toplam flavonoid madde miktarlarının varyans (ANOVA) analizleri yapılmıştır. Programda linear, kubik, kuartik ve kuadratik modeller analiz edilmiştir ve Tablo 4.9'da gösterilmiştir. Yapılan analizlerde toplam flavonoid madde miktarı sonuçları için en uygun yüzey yanıt modelinin kuartik model olduğu görülmüştür.

Tablo 4.9: Toplam flavonoid madde miktarı için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri.

Model	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-Değeri	
Linear model	100,07	3	33,36	10,86	0,0004	anlamlı
Kuadratik model	115,60	9	12,84	3,82	0,0241	anlamlı
Kubik model	144,27	14	10,31	10,41	0,0087	anlamlı
Kuartik model	144,27	14	10,31	10,41	0,0087	anlamlı

Model belirlemede toplam flavonoid madde miktarı optimizasyonu için Design Expert-12'nin kuartik denklemlerinin ANOVA testi sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir. Kurulan modelin anlamlılığı 0,008 olarak hesaplanmıştır. Bağımsız

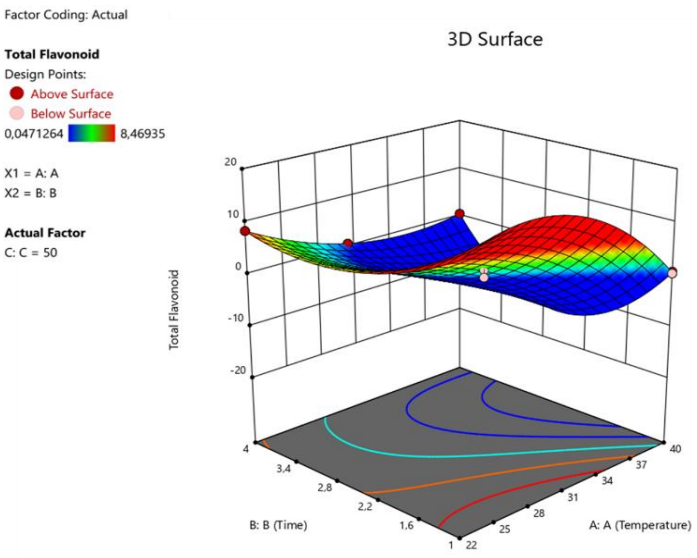
değişkenlerden sıcaklık ve sürenin p değerlerinin 0,05'in altında olduğu ve istatistiksel açıdan ekstraksiyon veriminde toplam flavonoid madde miktarını etkilediği görülmektedir. Etanol konsantrasyonun istatistiksel olarak bir etkisi belirlenememiştir. Modelde R^2 değeri 0,9668'dir ve toplam değişimin %97'sinin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini göstermektedir.

Tablo 4.10: Toplam flavonoid madde miktarı optimizasyonu için Design Expert-12'nin kuartik denklemleri ile varyans (ANOVA) analizleri.

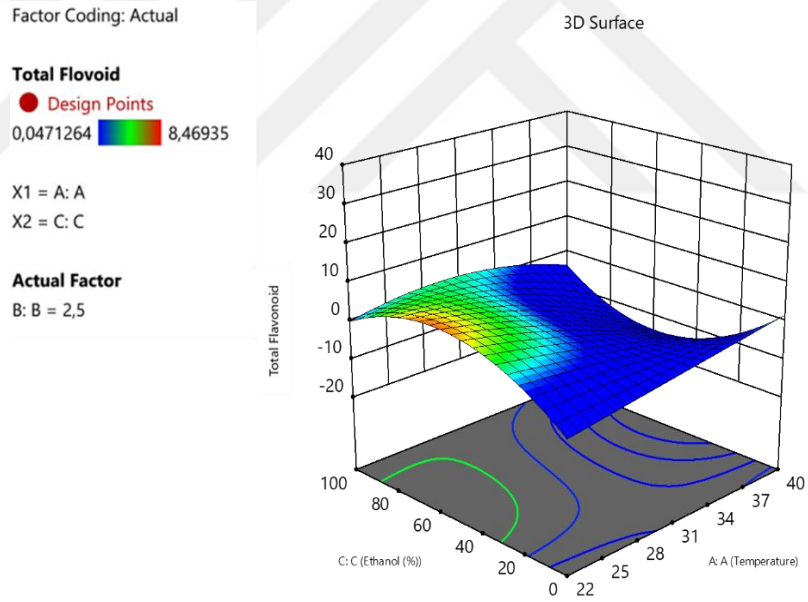
Kaynak*	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin Ortalaması	F Değeri	p-Değeri
Model	144,27	14	10,31	10,41	0,0087
A-A	9,22	1	9,22	9,31	0,0284
B-B	10,53	1	10,53	10,63	0,0224
C-C	4,49	1	4,49	4,54	0,0864
AB	1,19	1	1,19	1,20	0,3227
AC	3,35	1	3,35	3,39	0,1251
BC	4,83	1	4,83	4,88	0,0782
A^2	2,43	1	2,43	2,46	0,1779
B^2	4,09	1	4,09	4,13	0,0978
C^2	1,57	1	1,57	1,59	0,2633
ABC	4,12	1	4,12	4,17	0,0967
A^2B	20,45	1	20,45	20,66	0,0061
A^2C	1,57	1	1,57	1,58	0,2639
AB^2	5,33	1	5,33	5,38	0,0680
AC^2	3,91	1	3,91	3,95	0,1036
Hata	4,95	5	0,9899		
Düzeltilmiş Toplam	149,22	19			
R^2=0,9668	R^2adj=0,8740				

*A: Sıcaklık, B: Süre, C: Konsantrasyon

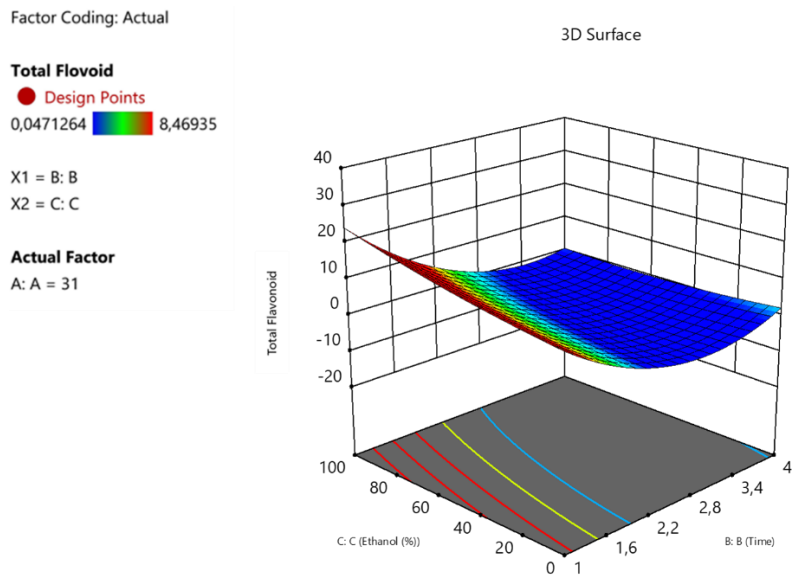
Design Expert programında *P. spinosa* meyvesinin toplam flavonoid madde miktarı üzerindeki etkisini incelediğimiz ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu parametrelerinin etkisini belirlemek için 3 boyutlu grafikleri oluşturulmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin etkisi Şekil 4.8'de, Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonunun etkisi Şekil 4.9'da ve ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonunun etkisi Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8: İncelenen parametrelerin toplam flavonoid madde miktarı üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi fonksiyonuna göre).

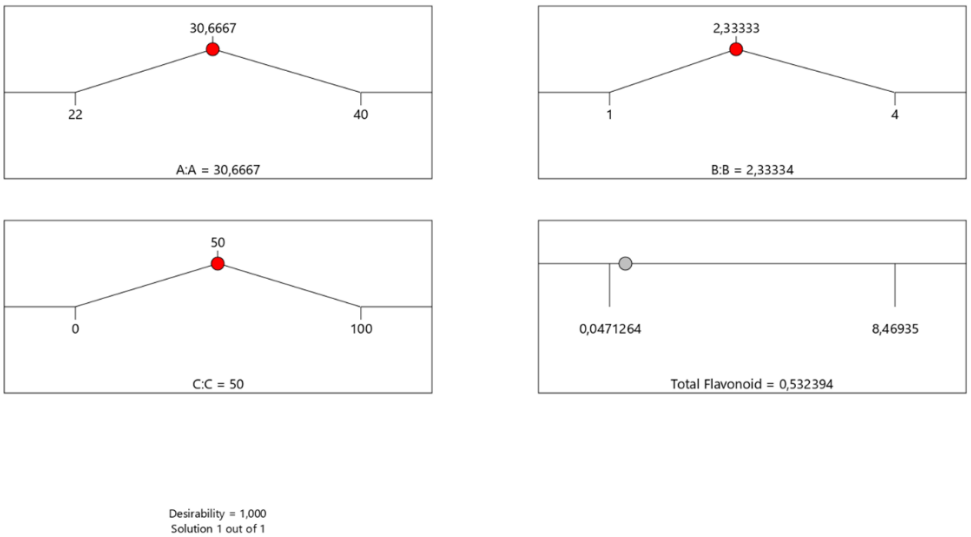


Şekil 4.9: İncelenen parametrelerin toplam flavonoid madde miktarı üzerindeki etkisi (Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu fonksiyonuna göre).



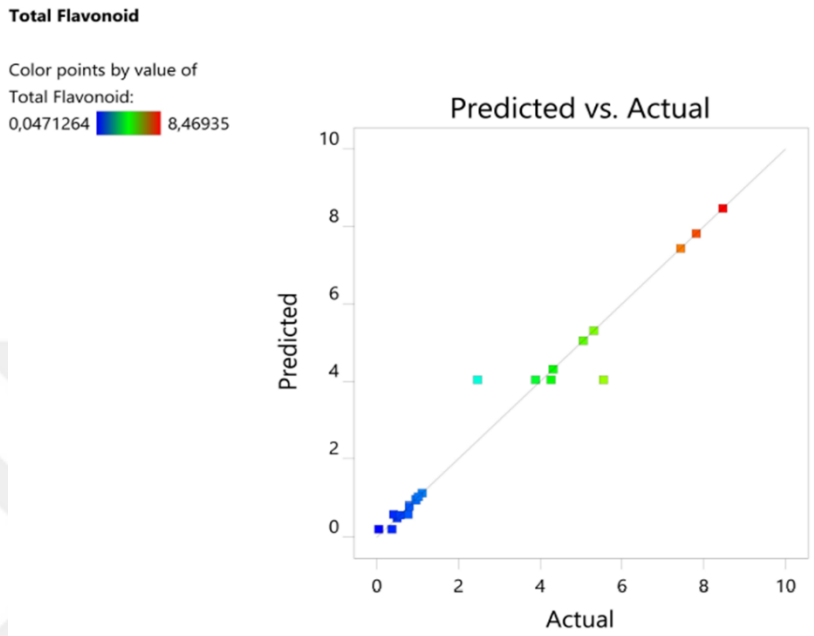
Şekil 4.10: İncelenen parametrelerin toplam flavonoid madde miktarı üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu fonksiyonuna göre).

Design-Expert-12 programı ile optimizasyon seçimi kullanılarak toplam flavonoid madde miktarı için optimize ekstraksiyon kriterleri; ekstraksiyon sıcaklığı 30,66°C, ekstraksiyon süresi 2,3 saat ve etanol konsantrasyonu %50 olarak belirlenmiştir. Optimizasyonda elde edilen maksimum toplam flavonoid madde miktarı konsantrasyonu 0,53'tür. Optimize edilmiş sıcaklık, süre ve etanol/su konsantrasyonu koşulları Şekil 4.11'de sunulmuştur.



Şekil 4.11: Toplam flavonoid madde miktarının optimizasyonu.

Modelde öngörülen toplam flavonoid madde miktarı sonucunun, deneylerde elde edilen ekstre verileri ile iyi uyum içinde olduğu görülmektedir. Deneysel ve öngörülen veriler arasındaki ilişki Şekil 12'de gösterilmektedir.



Şekil 4.12: Modelde öngörülen değerler ile deneysel olarak elde edilen toplam flavonoid madde miktarı değerleri arasındaki ilişki.

4.6.3 Toplam antosiyanin madde miktarının optimizasyonu

Meyve ekstrelerindeki saptanan toplam antosiyanin madde miktarlarının varyans (ANOVA) analizleri programda linear, kubik, kuartik ve kuadratik modeller ile analiz edilmiştir ve Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

Bu modellerde istatistiksel açıdan anlamlı bir denklem kurulamadığından karekök, doğal logaritma, 10 tabanlı logaritma, ters karekök, ters ve güç dönüşümleri ile analiz tekrar yapılmıştır (Tablo 4.12). Karekök dönüşümlü analizinde toplam antosiyanin madde miktarı sonuçları için kuadratik modelin en uygun olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.11: Toplam antosiyanin madde miktarı için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri.

Model	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-Değeri	
Linear model	40685,18	3	13561,73	2,67	0,0830	anlamsız
Kuadratik model	80138,91	9	8904,32	2,12	0,1284	anlamsız
Kubik model	92697,94	14	6621,28	1,13	0,4853	anlamsız
Kuartik model	92697,94	14	6621,28	1,13	0,4853	anlamsız

Tablo 4.12: Toplam antosiyanin madde miktarı için Design Expert-12'de kakekök dönüşümlü varyans (ANOVA) analizleri.

Model	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-Değeri	
Linear model	84,45	3	28,15	3,28	0,0484	anlamlı
Kuadratik model	164,93	9	18,33	3,22	0,0415	anlamlı
Kubik model	184,53	14	13,18	1,76	0,2760	anlamsız
Kuartik model	184,53	14	13,18	1,76	0,2760	anlamsız

Model belirlemede toplam antosiyanin madde miktarı optimizasyonu için Design Expert-12'nin karekök dönüşümlü kuadratik denklemlerinin ANOVA testi sonuçları Tablo 4.13'de verilmiştir. Kurulan modelin anlamlılığı 0,04 olarak hesaplanmıştır. Bağımsız değişkenlerden sıcaklık ve sürenin p değerlerinin 0,05'in üstünde belirlenmiştir. Etanol konsantrasyonun p değerinin 0,05'in altında olması istatistiksel açıdan ekstraksiyon veriminde toplam antosiyanin madde miktarını etkilediğini göstermektedir. Modelin başarısını ölçen uyum eksikliği 0,7521 olarak belirlenmiş ve istatistiki olarak anlamlı değildir. Modelde 0,7432 olan R^2 değeri toplam değişimin %74'ünün bağımsız değişkenler ile açıklanacağını göstermektedir.

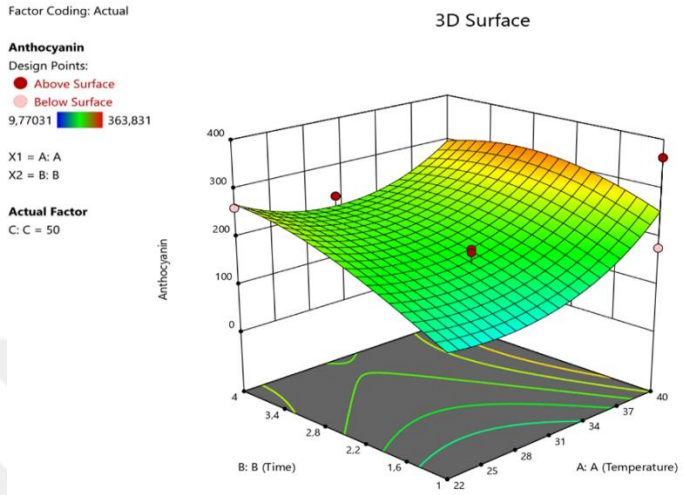
Tablo 4.13: Toplam antosiyanin madde miktarı optimizasyonu için Design Expert-12'nin karekök dönüşümlü kuadratik denklemleri ile varyans (ANOVA) analizleri.

Kaynak*	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-Değeri
Model	164,93	9	18,33	3,22	0,0415
A-A	23,22	1	23,22	4,07	0,0712
B-B	24,64	1	24,64	4,32	0,0643
C-C	44,57	1	44,57	7,82	0,0189
AB	6,95	1	6,95	1,22	0,2952
AC	0,1822	1	0,1822	0,0320	0,8617
BC	5,66	1	5,66	0,9927	0,3426
A^2	17,40	1	17,40	3,05	0,1111
B^2	4,68	1	4,68	0,8207	0,3863
C^2	37,01	1	37,01	6,49	0,0289
Arta Kalan	56,98	10	5,70		
Uyum eksikliği	19,61	5	3,92	0,5245	0,7521
Hata	37,38	5	7,48		
Düzeltilmiş Toplam	221,91	19			
R^2=0,7432	R^2adj=0,5121				

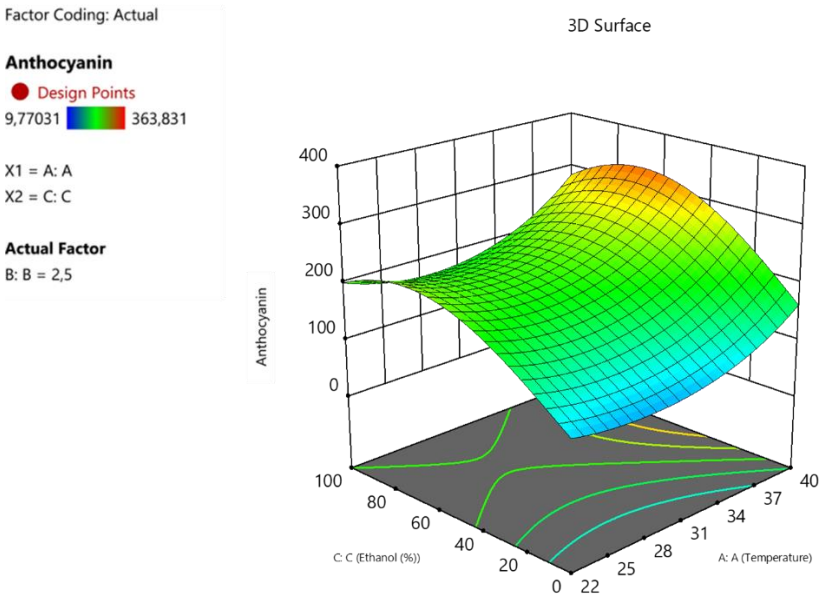
*A: Sıcaklık, B: Süre, C: Konsantrasyon

İncelediğimiz ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu parametrelerinin *P. spinosa* meyvesinin toplam antosiyanin madde miktarı üzerindeki etkisini belirlemek için 3 boyutlu grafikleri oluşturulmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı ve

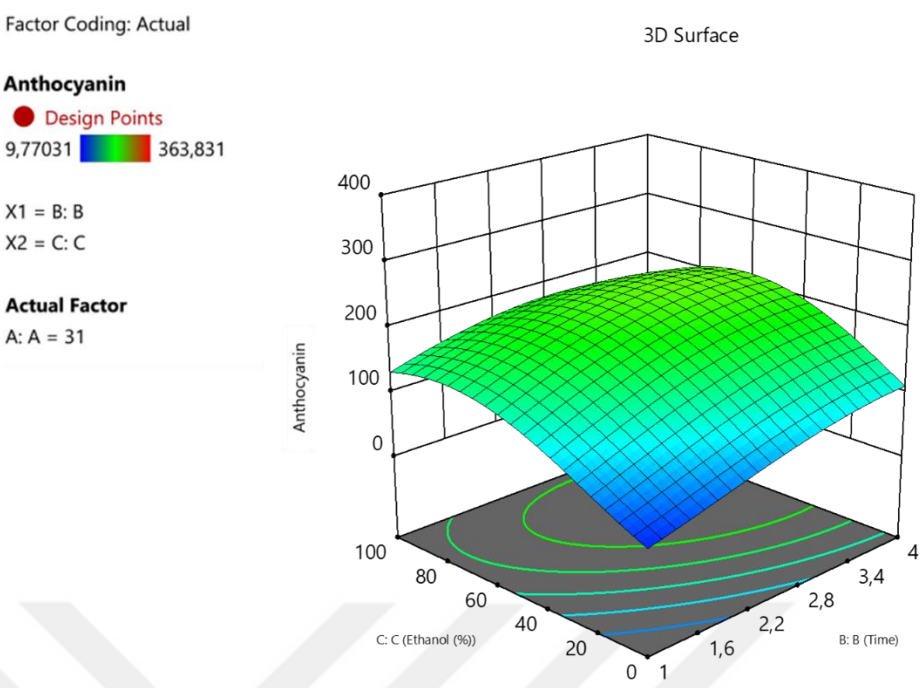
ekstraksiyon süresinin etkisi Şekil 4.13'de, Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonunun etkisi Şekil 4.14'de ve ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonunun etkisi Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13: İncelenen parametrelerin toplam antosiyanin madde miktarı üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi fonksiyonuna göre).

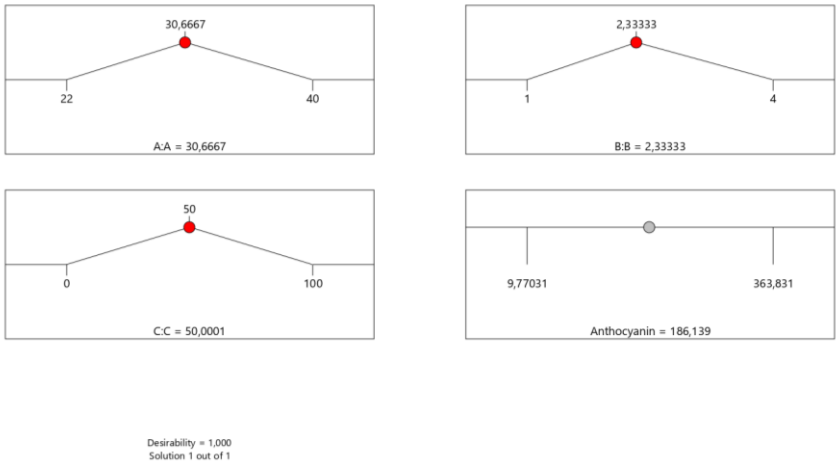


Şekil 4.14: İncelenen parametrelerin toplam antosiyanin madde miktarı üzerindeki etkisi (Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu fonksiyonuna göre).



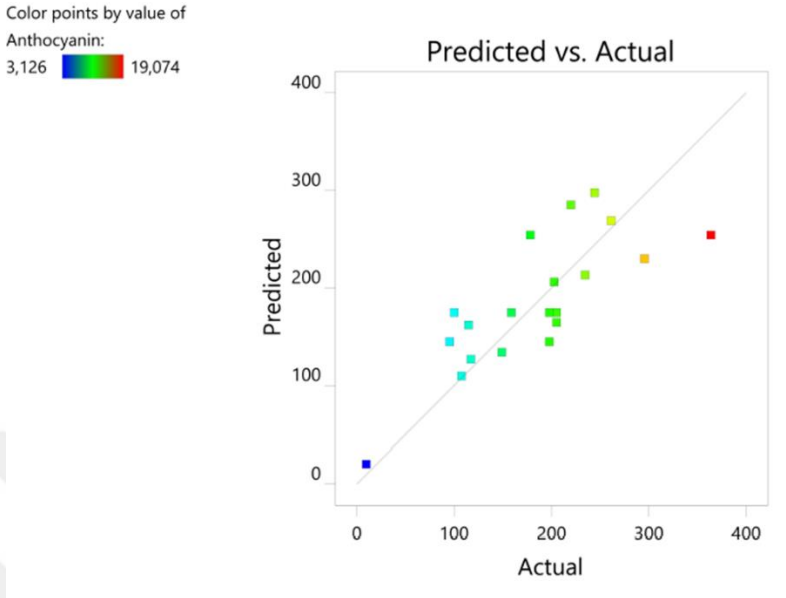
Şekil 4.15: İncelenen parametrelerin toplam antosiyanin madde miktarı üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi fonksiyonuna göre).

Program ile optimizasyon seçimi kullanılarak toplam antosiyanin madde miktarı için optimize ekstraksiyon kriterleri; ekstraksiyon sıcaklığı 31,00°C, ekstraksiyon süresi 2,5 saat ve etanol konsantrasyonu %50 olarak tespit edilmiştir. Optimizasyonda elde edilen maksimum toplam antosiyanin madde miktarı konsantrasyonu 186,13'tür. Optimize edilmiş sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu koşulları Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16: Toplam antosiyanin madde miktarının optimizasyonu.

Deneylerde elde edilen ekstre verileri ile modelde öngörülen toplam antosiyanin madde miktarı sonuçları, uyumlu olduğu görülmektedir. Deneysel ve öngörülen veriler arasındaki ilişki Şekil 4.17'de verilmektedir.



Şekil 4.17: Modelde öngörülen değerler ile deneysel olarak elde edilen toplam antosiyanin madde miktarı değerleri arasındaki ilişki.

4.6.4 DPPH radikal giderme aktivitesinin optimizasyonu

Ekstrelerdeki belirlenen DPPH radikal giderme aktivitesinin varyans (ANOVA) analizleri gerçekleştirilmiştir. Deney verileri sonucunda hesaplanan IC_{50} değerleri linear, kubik, kuartik ve kuadratik modeller ile programda analiz edilmiştir (Tablo 4.14). Analizler sonucunda DPPH radikal giderme aktivitesi sonuçları için linear modelin en uygun olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.14: Toplam DPPH radikal giderme aktivitesi için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri.

Model	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-Değeri	
Linear model	88506,61	3	29502,20	3,28	0,0484	anlamlı
Kuadratik model	1,223E+05	9	13584,50	1,23	0,3732	anlamsız
Kubik model	2,145E+05	14	15320,97	4,23	0,0601	anlamsız
Kuartik model	2,145E+05	14	15320,97	4,23	0,0601	anlamsız

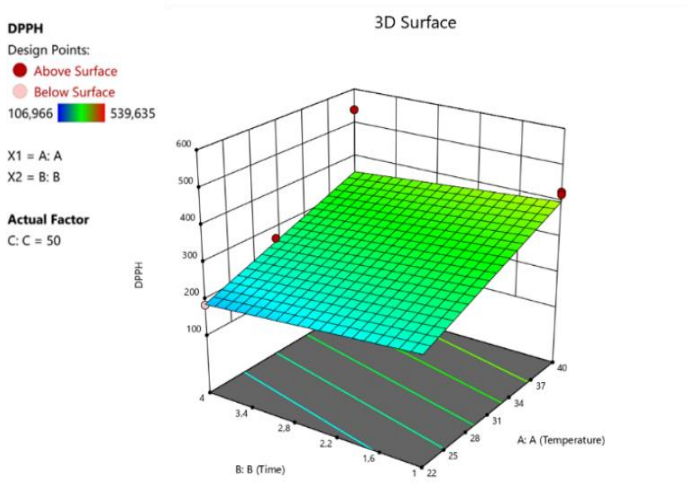
DPPH radikal giderme aktivitesi optimizasyonu için model belirlemede Design Expert-12'nin linear denklemlerinin ANOVA analizi sonuçları aşağıda verilmiştir (Tablo 4.15). Kurulan modelin anlamlılığı 0,04 olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerden süre ve etanol konsantrasyonun p değerlerinin 0,05'in üstünde olduğu görülmüştür. Sıcaklığın p değerinin 0,05'den düşük olduğu ve istatistiksel olarak ekstraksiyon veriminde DPPH radikal giderme aktivitesini etkilediği görülmektedir. Modelin başarısını ölçen uyum eksikliği 0,1070 olarak belirlenmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı değildir. R^2 değeri 0,3805 toplam değişimin sadece %38'ini bağımsız değişkenlere atfedilebilir.

Tablo 4.15:DPPH radikal giderme aktivitesinin optimizasyonu için Design Expert-12'nin linear denklemleri ile varyans (ANOVA) analizleri.

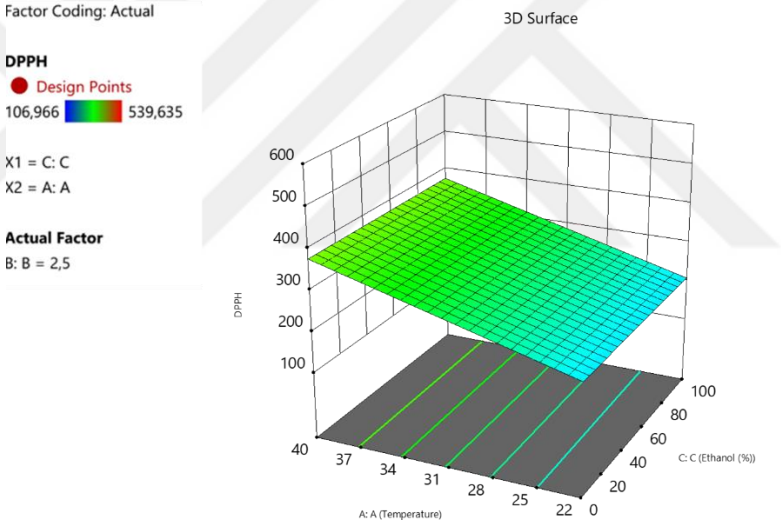
Kaynak*	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-Değeri
Model	88506,61	3	29502,20	3,28	0,0484
A-A	84796,32	1	84796,32	9,42	0,0073
B-B	5524,96	1	5524,96	0,6135	0,4449
C-C	10,51	1	10,51	0,0012	0,9732
Arta Kalan	1,441E+05	16	9006,10		
Uyum eksikliği	1,260E+05	11	11453,36	3,16	0,1070
Hata	18110,73	5	3622,15		
Düzeltilmiş Toplam	2,326E+05	19			
R^2=0,3805	R^2adj=0,2643				

*A: Sıcaklık, B: Süre, C: Konsantrasyon

P. spinosa meyve ekstresinin DPPH radikal giderme aktivitesi üzerindeki ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu parametrelerinin etkisini belirlemek için yüzey yanıt yönteminde 3 boyutlu grafikleri oluşturulmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin etkisi Şekil 4.18'de, Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonunun etkisi Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

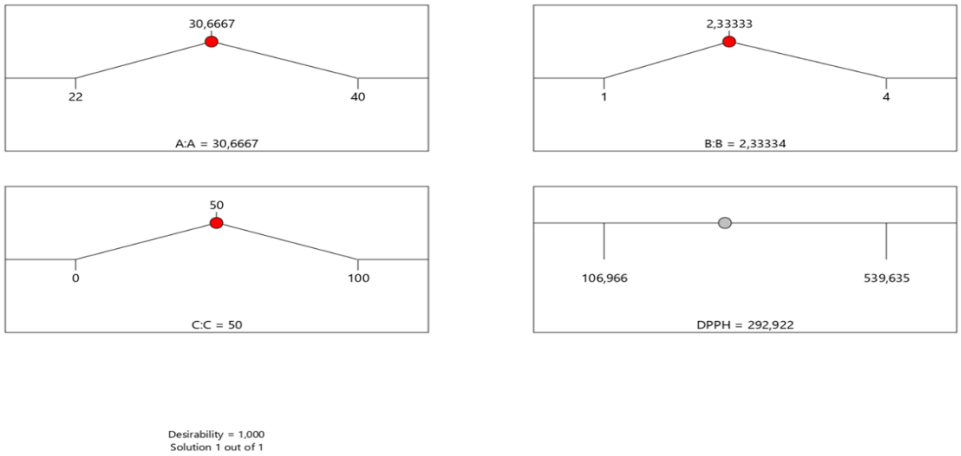


Şekil 4.18: İncelenen parametrelerin DPPH radikal giderme aktivitesi üzerindeki etkisi (Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi fonksiyonuna göre).



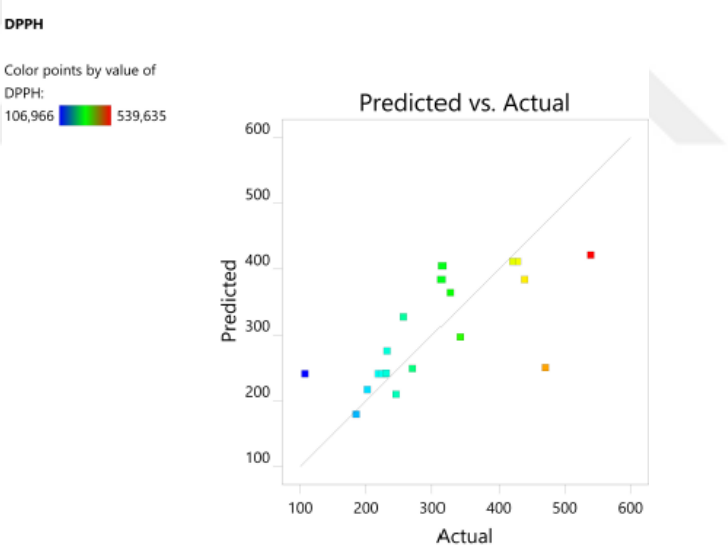
Şekil 4.19: İncelenen parametrelerin DPPH radikal giderme aktivitesi üzerindeki etkisi (Etanol sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu fonksiyonuna göre).

Design-Expert-12 programı ile optimizasyon seçimi kullanılarak DPPH radikal giderme aktivitesi için optimize ekstraksiyon kriterleri; ekstraksiyon sıcaklığı 30,66°C, ekstraksiyon süresi 2,3 saat ve etanol konsantrasyonu %50 olarak tespit edilmiştir. Optimizasyonda elde edilen maksimum toplam antosiyanin madde miktarı konsantrasyonu 292,92'dir. Optimize edilmiş sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu koşulları Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20: DPPH radikal giderme aktivitesi madde miktarının optimizasyonu.

Modelden öngörülen DPPH radikal giderme aktivitesi sonucunun, deneylerde elde edilen ekstre verileri ile beklendiği kadar yüksek oranda uyum bulunamamıştır. Öngörülen veriler ve deneysel verilerin ilişkisi Şekil 4.21'de gösterilmektedir.



Şekil 4.21: Modelde öngörülen değerler ile deneysel olarak elde edilen DPPH radikal giderme aktivitesi değerleri arasındaki ilişki.

4.6.5 ABTS radikal giderme aktivitesinin optimizasyonu

Ekstrelerdeki belirlenen ABTS radikal giderme aktivitesi ile hesaplanan IC_{50} değerlerinin varyans (ANOVA) analizleri gerçekleştirilmiştir. Programda linear, kubik, kuartik ve kuadratik modeller ile analiz yapılmıştır (Tablo 4.16). Bu modellerde

istatistiksel açıdan anlamlı bir denklem kurulamamıştır. Bu yüzden karekök, doğal logaritma, 10 tabanlı logaritma, ters karekök, ters ve güç dönüşümleri ile analiz gerçekleştirilmiştir. Fakat ABTS radikal giderme aktivitesi için bu analizlerin sonucunda da istatistiksel açıdan anlamlı bir denklem kurulamadığı için yüzey yanıt yönteminde değerlendirme yapılamamıştır.

Tablo 4.16: Toplam ABTS radikal giderme aktivitesi için Design Expert-12'de varyans (ANOVA) analizleri.

Model	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-Değeri	
Linear model	3307,78	3	1102,59	0,8169	0,5032	anlamsız
Kuadratik model	9946,24	9	1105,14	0,7389	0,6700	anlamsız
Kubik model	17304,81	14	1236,06	0,8135	0,6534	anlamsız
Kuartik model	17304,81	14	1236,06	0,8135	0,6534	anlamsız

Bağımsız değişken olarak belirlenen ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu parametrelerinin etkisi belirlemek için kullanılan yüzey yanıt metodolojisi sonuçlarına göre *P. spinosa* meyvesinin ekstresindeki optimum koşullar Tablo 4.17'de verilmiştir.

Toplam flavonoid madde miktarında sıcaklık ve sürenin, antosiyanin miktarında etanol konsantrasyonunun ve DPPH radikal giderme aktivitesinde ise sıcaklığın etkili olduğu istatiksel olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.17: Optimum koşulların karşılaştırılması.

	Sıcaklık (ºC)	Süre (saat)	Etanol konsantrasyonu	Öngörülen değerler
Flavonoid madde miktarı (mg/g)	30,66	2,3	50	0,53
Antosiyanin miktarı (mg C3G/100g)	31,00	2,5	50	199,25
DPPH (IC_{50} µg/ml)	30,66	2,3	50	292,92

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yabani olarak yetişen meyvelerin sahip oldukları biyoaktif bileşiklerden dolayı insan sağlığı için son derece önemli olduğu bilinmektedir. Bunun temel sebeplerinden biri de içerdikleri önemli bileşenlerdir. Bunların başında antioksidanlar ve fenolik bileşikler gelmektedir. Bu çalışmada ülkemizde daha çok çakal eriği olarak bilinen, yabani bir erik türü olan *Prunus spinosa* bitkisinde; toplam antosiyanin içeriği, toplam fenolik madde içeriği, toplam flavonoid içeriği ve antioksidan aktitivitelerini belirleyebilmek için kullanılan ekstrelerin hazırlanmasında yüzey yanıt yöntemi kullanılarak ideal ekstre koşullarının ne olduğu belirlenmiştir. Toplam antosiyanin içeriği pH diferansiyel metodu ile toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu yöntemiyle, toplam flavonoid içeriği alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitesi için ABTS ve DPPH metodu kullanılmıştır.

Bu bölümde *P. spinosa* meyvesinin değişik konsantrasyonlarda hazırlanan su, etanol, etanol-su ekstresinde antioksidan aktivite, toplam fenolik madde miktarları ile ilgili ulaşılan bazı sonuçlar özetlenmiştir.

P. spinosa meyveleri % verimi bakımından incelendiğinde en yüksek verimine 30ºC sıcaklıkta 4 saat süreyle hazırlanan 11 numaralı su ekstresinde 31,65 olarak ulaşılmıştır. Yüzey yanıt yöntemiyle belirlenen deney tasarımlarına göre hazırlanan 20 meyve ekstresinin 3 tekrarlı analizleri sonucunda toplam fenolik madde miktarlarının 11,02 mg/g-19,03 mg/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı açısından en yüksek değerler; su ekstrelerinde 14,71 mg/g ile 17 numaralı ekstre (sıcaklık:40 ºC, süre:2 saat), etanol ekstrelerinde 16,74 mg/g ile 20 numaralı ekstre (sıcaklık:40 ºC, süre:4 saat) ve etanol-su ekstrelerinde 19,03 mg/g ile 15. ekstre (sıcaklık:40 ºC, süre:1 saat) olarak bulunmuştur Aynı zamanda 15 numaralı ekstre tüm ekstreler içinde de en yüksek toplam fenolik madde miktarına sahiptir. Her üç ekstre yönteminde de sıcaklığın 40 ºC olduğu dikkat çekmektedir. Elde edilen verilerimiz çözücü oranının toplam fenolik madde miktarını değiştirdiğini ve önemli bir değişken olduğunu göstermektedir. En yüksek toplam fenolik madde miktarının elde edildiği

ekstrenin konsantrasyonunun %50 olması yüzey yanıt yönteminde DPPH için belirlenen ideal konsantrasyonun da %50 olması ile uyum göstermektedir.

Türün farklı deney koşullarında meyve ekstrelerindeki toplam flavonoid madde miktarı değerlerinin 8,47 mg/g-0,05 mg/g aralığında olduğu belirlenmiştir. En yüksek değerler; etanol-su ekstrelerinde 5. ekstrede (sıcaklık:22 ºC, süre:4 saat) 8,47 mg/g, etanol ekstreleri arasında 10. ekstrede (sıcaklık:30 ºC, süre:2 saat) 7,82 mg/g, su ekstreleri içinde de 1. ekstre (sıcaklık:22ºC, süre:1 saat) 4,31 mg/g olarak bulunmuştur. Toplam flavonoid madde miktarı açısından ekstre sonuçlarını değerlendirdiğimizde sıcaklık değişkeninin 22-30 ºC arasında değiştiğini ama en yüksek değere 22 ºC ulaşıldığı saptanmıştır. Ekste süresi oldıkça değişkenlik göstermektedir. Çözücü olarak etanol-su yönteminin (%50 konsantrasyon) daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Bu ekstrenin konsantrasyonu hem toplam fenolik madde miktarında hem de yüzey yanıt yönteminde DPPH için belirlenen ideal konsantrasyon ile uyumludur.

Analiz edilen 20 ekstrede toplam antosiyanin miktarı 9,77 mgC3G/100g-364 mgC3G/100g arasında değişmektedir. Toplam antosiyanin miktarı bakımından en yüksek değerler; etanol-su ekstrelerinde 14. ekstrede (sıcaklık:40ºC, süre:1 saat) 364 mgC3G/100g, etanol ekstrelerinden 20. ekstrede (sıcaklık:40ºC, süre:4 saat) 296 mgC3G/100g ve su ekstreleri arasında 16. ekstrede (sıcaklık:40ºC, süre:2 saat) 198 mgC3G/100g olarak tespit edilmiştir. 16 ve 17 numaralı ekstreler aynı şartlar altında hazırlanan ekstreler olmasına rağmen birbirinden oldukça farklı değerler bulunmuştur. Ayrıca 3 tekrarlı şekilde hazırlanan 20 yöntemde toplamda 60 ekstrede aynı koşullar altında hazırlanan diğer ekstreler arasında da farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu farklılığın meyve içerine veya deney sırasında kontrol edilemeyen faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir. En yüksek değerlerin %50 etanol konsantrasyonu kullanılan ekstrede bulunması ile yüzey yanıt yöntemindeki optimizasyon sonuçları benzerlik göstermektedir.

Antioksidanların radikal giderici özelliklerinin saptanmasında kullanılan DPHH yöntemi sonucunda çakal eriği (*P. spinosa*) antioksidan aktivitesi IC_{50} değerleri su ekstresinde 231,85 µg/ml-438,93 µg/ml etanol ekstresinde 230,69 µg/ml-470,52 µg/ml, etanol-su ekstrelerinde 106,97 µg/ml- 178,30 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

DPPH radikal giderme aktivitesinin en yüksek gözlemlendiği örnek 4 numaralı örnek olup, 22ºC ve 2 saat süre ile etanol-su (3:1) çözücüsüyle ekstre hazırlanmıştır. Ayrıca ABTS yöntemi antioksidan aktiviteyi belirlemek için uygulanmıştır. Antioksidan etkinlikleri su, etanol, etanol-su ekstrelerinde belirlenmiştir. IC_{50} değerleri su ekstrelerinde 110,51 µg/ml-173,12 µg/ml, etanol ekstrelerinde 105,92 µg/ml -201,59 µg/ml ve etanol-su ekstrelerinde 49,34 µg/ml-155,19 µg/ml olarak saptanmıştır. Her iki antioksidan aktivite belirleme yönteminde etanol su ekstrelerinin en yüksek değer verdiği belirlenmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde ekstre yönteminde değerlendirilen toplam fenolik bileşikler, ABTS ve DPPH radikal giderme aktiviteleri açısından en yüksek değerlerin sırasıyla etanol-su, etanol ve suda elde edildiği belirlenmiştir. Türün meyve ekstresinde en iyi çözücü konsantrasyonun %50 olduğu görülmektedir. Bu veriler yüzey yanıt yöntemindeki optimizasyon sonuçları ile uyumludur.

Bağımsız değişken olarak belirlenen ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu parametrelerinin etkisi belirlemek için kullanılan yüzey yanıt metodolojisi sonuçlarına göre *P. spinosa* meyvesinin ekstresindeki optimum koşullar; sıcaklık: 30 ºC, süre: 2 saat ve konsantrasyon: %50 olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmelere göre toplam flavonoid madde miktarında sıcaklık ve sürenin, antosiyanin miktarında etanol konsantrasyonunun ve DPPH radikal giderme aktivitesinde ise sıcaklığın etkili olduğu istatiksel olarak belirlenmiştir.

Elde edilen toplam fenolik bileşik değerleri ile ABTS ve DPPH radikal giderme aktiviteleri arasında paralellik göstermediği tespit edilmiştir. Ekstreler dikkatli incelendiğinde toplam fenolik madde miktarı en yüksek 40 ºC sıcaklıkta 1 saat süreyle su-etanol (1:1) çözücüsüyle ekstre edilen 15 numaralı örnekte gözlemlenirken, DPPH radikal giderme aktivitesinin en yüksek gözlemlendiği örnek 22 ºC 2 saat süreyle etanol-su (3:1) çözücüsüyle ekstre edilmiş 4 numaralı örnektir. Gıdaların ve bitkilerin antioksidan aktivite göstermesi sadece fenolik bileşiklerden kaynaklanmayabilir; C ve E vitaminleri, karotenoidler, Cu, Zn, Se, Fe gibi mineraller, aminoasitler, melanoidinler, sülfitler, fitatlar, glukonatlar, kumarinler, terpenler, ligninler, indoller, izosiyanatlar ve fitalidler gibi maddelerde etkili olmasını sağlayabilmektedir [147]. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar dikkatli incelendiğinde toplam fenolik bileşik ve antioksidan aktivite arasındaki negatif kolerasyonun hangi bileşiklerden kaynaklandığıyla ilgili daha kapsamlı çalışma yapılmalıdır.

Tez kapsamında *P. spinosa* meyvesinin toplam fenolik madde ve serbest radikalleri yakalama aktivitesince zengin olduğu sıcaklık, süre ve çözücü konsantrasyonu parametreleri için yüzey yanıt metodolojisi ile belirlenen optimum koşulların türden yararlanma çalışmalarına sağlayacağı katkı oldukça önemlidir. Ülkemizde geleneksel gıda olarak kullanımı olan bu türün sağlıklı beslenme diyetlerine de katılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] **Gezgin, D.** (2007). *Bitki mitosları*. Sel Yayıncılık, İstanbul.

[2] **Akbulut, S., Özkan, Z.C., and Kalankan, G.** (2017). Some plants and their effects used in traditional treatment of diseases at Çorum Province in Turkey. *International Journal of,* 4, 330-339.

[3] **Egea, I., Sánchez-Bel, P., Romojaro, F., Pretel, M.T.** (2010). Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods Human Nutrition,* 65(2), 121-129.

[4] **Huang, D., Boxin, O.U., Prior, R.L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agricultural Food Chemistry,* 53(6), 1841-1856.

[5] **Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E.** (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International,* 88(5), 1269-1278.

[6] **Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D.** (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotherapy Research*, 21(7), 615-21.

[7] **Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D.** (2004). Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa. Fitoterapia*, 75(1), 77-80.

[8] **Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., Ferreira, I.** (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry,* 120(1), 247-254.

[9] **Başkaya Sezer, D., Tokatlı Erdoğan, K., Demiröven, A., Fac, J.A.** (2016). Çakal Eriği ve Yonuz Eriği Marmelatları. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* 33, 125-131.

[10] **Ruiz-Rodríguez, B.M., Ancos, B., Sanchez-Moreno, C., Fernandez-Ruiz V.** (2014). Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Furits,* 69(1), 61-73.

[11] **Fraternale, D., Giamperi, l., Bucchini, A.** (2009). *Prunus spinosa* fresh fruit juice: antioxidant activity in cell-free and cellular systems. *Natural product communications,* 4(12), 1655-1670.

[12] **Ayla, Ş., Günal, M.Y., Sayın Şakul, A.A., Biçeroğlu, Ö., Özdemir, E.M., Okur, M.E., Polat, D.Ç.** (2017). Effects of *Prunus spinosa* L. fruits on experimental wound healing. *Medeniyet medical journal,* 32(3), 152-8.

[13] **URL-1** <http://www.tubives.com/>.

[14] **Akkemik, Ü.** (2018). *Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıları.* Ankara :T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü.

[15] **Browicz, K.** (1972). *Prunus spinosa* L.(E.d: Davis, P.H.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands,* 4, 8-12.

[16] **Dönmez, A.A., Yıldırımlı, Ş.** Taxonomy of the genus *Prunus* L.(Rosaceae) in Turkey. *Tübitak,* 24(3), 187-202.

[17] **URL-2** < http://powo.science.kew.org/taxon/730297-1>.
[18] **Baytop, T.J.B.** (1997). *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü* (3 bs.). Ankara: TDK.
[19] **Tuzlacı, E.J.A.B.** (2011). *Türkiye Bitkileri Sözlüğü (A Dictionary of Turkish Plants),* 975-605.
[20] **Gey, K.** (1991). Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1), 326-334.
[21] **Gey, K.F. (**1990**)**. *Biochemical Society Transactions*. The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms,18, Portland Press Ltd.
[22] **Kültür, Ş.** (2008). An ethnobotanical study of Kırklareli. *Phytologıa Balcanıca,* 14(2), 279-289.
[23] **Mustafa, B., Ajdaari A., Pajazita, Q., Syla, B., Quave C.L., Pieroni, A.** (2012). An ethnobotanical survey of the Gollak region, *Genet Resour Crop Evol,* 59(5), 739-754.
[24] **Poonam, V., Kumar, G., Reddy, S., Join, R., K.Sharma, S., K.Prasad, A., S.Parmar, V.** (2011). Chemical constituents of the genus *Prunus* and their medicinal properties. *Current Medican Chemistry,* 18, 3758-3824.
[25] **Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E.** (2012). *Domestication of Plants in the Old World*. The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. Oxford University Press on Demand.
[26] **Calvo, M., Cavero, R.** (2014). Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from official sources. J*ournal of Ethnopharmacology,* 157, 268-273.
[27] **Calvo, M.I., Akerreta, S., Cavero, R.Y.** (2013). The pharmacological validation of medicinal plants used for digestive problems in Navarra, Spain *European Journal of Integrative Medicine,* 5(6), 537-546.
[28] **Berger, F.** (1949). *Handbuch der drogenkunde.*
[29] **Blumenthal, M.** (1999). T*he Complete German Commission E Monographs, Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin*. American Botanical Council, Texas.
[30] **Graf, E.** (1982). *Taschenbuch der Drogenkunde. Von HA Hoppe; W. de Gruyter Verlag,* 11(2), 61-61.
[31] **Wawrzyniak, E.** (1992). *Leczenie ziołami Kompendium fitoterapii*.
[32] **Baytop, T.** (1999). *Türkiye'de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün.* Nobel Tıp Kitabevleri.
[33] **Türkan, Ş., Malyer, H., Özaydın, S., Tümen, G.** (2006). Ordu ili ve çevresinde yetişen bazı bitkilerin etnobotanik özellikleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 10(2).
[34] **Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C.** (2007). PDR for herbal medicines, Thomson, Reuters.
[35] **Bulut, G.** (2011). Folk medicinal plants of Silivri (İstanbul, Turkey*). Marmara Pharmaceutical Journal,* 15, 25-29.
[36] **Güneş, F.** (2018). Edirne'nin İpsala İlçesinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler. *Research Journal of Biology Sciences,* 11(1), 29-37.
[37] **Tuzlacı, E.** (2006). *Şifa niyetine: Türkiye'nin bitkisel halk ilaçları*. Alfa yayınları.
[38] **Genç, G.E., and Özhatay, N.** (2006). An ethnobotanical study in Çatalca (European part of Istanbul). *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences,* 3(2), 73-89.

[39] **Kizilarslan, Ç. And Özhatay, N.** (2012). Wild plants used as medicinal purpose in the south part of İzmit (northwest Turkey). *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, 199-218.

[40] **Tuzlacı, E., İşbilen, D.F., Bulut, G.** (2010). Turkish folk medicinal plants, VIII: Lalapaşa (Edirne). *Marmara Pharmaceutical Journal, 14, 47-52.*

[41] **Kültür, Ş.** (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 341-364.

[42] **Tuzlacı, E., and Aymaz, P.E.** (2001). Turkish folk medicinal plants, part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia, 7*2(4), 323-343.

[43] **Naczk, M., Shahidi, F.** (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromotography A*, 1054(1-2), 95-111.

[44] **Dietrich, H.** *Bioactive compounds in fruit and juice*. Plant Food Human Nutrition, 1, 50-55.

[45] **Castrejón, A.D.R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L.W., Huyskens-Keil, S.** (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109(3), 564-572.

[46] **Sellappan, S., Akoh, C.C., Gerard, K.** (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Food Chemistry*, 50(8), 2432-2438.

[47] **Tsao, R., and Yang, R.** (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. J*ournal of Chromatography A*, 1018(1), 29-40.

[48] **Yıldız, H., and Baysal, T.** (2003). Bitkisel fenoliklerin kullanım olanakları ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Gıda Mühendisliği Dergisi,* **7**(14), 29-35.

[49] **Dai, J. and Mumper, R.** (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

[50] **Shahidi, F., and Ambigaipalan, P.** (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects–A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.

[51] **Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Lagona, A.** (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, 25(5), 469-495.

[52] **Jalili, T., Wildman, R.E.C., Medeiros, D.M.** (2001). Dietary fiber and coronary heart disease. *Nutraceuticals and Functional Foods*

[53] **Sorata, Y., Takahama, U., and Kimura, M.** (1984). Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochimia et Biophysica Acta(BBA)*, 799(3), 313-317.

[54] **Bravo, L.** (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.

[55] **McCord, J.M.** (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journol of Medicine*, 108(8), 652-659.

[56] **Peterson, J., Dewyer, J., Bhagwat, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A.L., Beecher, G., Aladesanmi, J.** (2005). Major flavonoids in dry tea. *Journal of Food Composition and Anaysis*, 18(6), 487-501.

[57] **D Archivio, M., Filesi, C., Di Benetto, R., Gorgiula, R., Giovannini C., Masella, R.** (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita,* 43(4), 348.

[58] **Kahraman, A., M. Serteser., Köken, T.** (2002). Flavonoidler. Kocatepe Tıp Dergisi, 3,1-8.

[59] **Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Perez, M., Hernandez-Perez, T.** (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—a review. *Plants Foods for Human Nutrition,* 65(3), 299-308.

[60] **Muhsiroğlu, Ö.** (2007). Flavonoller, Kardiyovasküler/Serebrovasküler Hastalıklar ve Kanser. *Beslenme ve Diyet Dergisi,* 45(2), 178-184.

[61] **Harborne, J.B., and Williams, C.** (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Naturel Product Reports,* 18(3), 310-333.

[62] **Davies, K.** (2004). *Plant pigments and their manipulation.* Blackwell Publishing, UK.

[63] **Giusti, M.** (2017). Applications of acylated anthocyanins as natural food colorants. *Food Sciens and Technology*, 8(1), 261-280.

[64] **Saldamlı, İ.,** (2007). *Gıda kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

[65] **Yoshida, K., M. Mori., and Kondo, T.** (2009). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports,* 26(7), 884-915.

[66] **Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun Y., Lin, Z., Liu, H.** (2013). *E*xtraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Seperation and Purification Technology*, 104, 17-25.

[67] **Cemeroglu, B., Velioglu, S., and Isik, S.** (1994). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *Journal of Food Sience, 59(6), 1216-1218.*

[68] **Walford, J.** (1980). *Historical development of food coloration.* 1, 1-25.

[69] **Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., Lim, S.S.** (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutrition Research,* 61(1).

[70] **Bell, D.R., and Gochenaur, K.** (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal Applied Physiology*, 100(4), 1164-1170.

[71] **Ghosh, D. and T.J.A.P.j.o.c.n. Konishi,** (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition,* 16(2).

[72] **Jayaprakasam, B., Vareed, S.K., Olson, L.K., Nair, M.** (2005). Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry,* 53(1), 28-31.

[73] **Khandare, V., Walia, S., Singh, M., Kaur, C.** (2011). Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioproducts Processing,* 89(4), 482-486.

[74] **Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Broullard, R.** (2003). *Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry,* 64(5), 923-933.

[75] **Giusti, M.M., and Wrolstad, R.E.** (2001). Current Protocols Food Analytical Chemistry. *Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy,* (1), F1. 2.1-F1. 2.13.

[76] **Öztan, T.** (2006). *Mor havuç, konsantresi, şalgam suyu, nar suyu ve nar ekşisi ürünlerinde antioksidan aktivitesi tayini ve fenolik madde profilinin belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[77] **Shinde, A., Ganu, J., Naik, P.** (2012). Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *Journal of Dental & Allied Sciences*, 1(2), 63.

[78] **Turrens, J.F.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335-344.

[79] **Halliwell, B. and J.M. Gutteridge.** (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

[80] **Valko, M., Leibfritz, D., Mancol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 39(1), 44-84.

[81] **Darley-Usmar, V., Wiseman, H., and Halliwell, B.** (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *Febbs Letters*, 369(2-3), 131-135.

[82] **Papas, A.** (1996). Lipids. *Determinants of antioxidant status in humans*, 31(1): S77.

[83] **Halliwell, B.** (2006). Reactive species and antioxidants, redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol and Biohemistry*, 141(2), 312-322.

[84] **Koppenol, W.H.** (2001). The Haber-Weiss cycle–70 years later. *Redox Report*, 6(4), 229-234.

[85] **Halliwell, B., and Gutteridge, J.M,** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry*, 219(1), 1-14.

[86] **Kohen, R., and Nyska, A.J.** (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.

[87] **Sundaresan, M., YU, Z.-X., Ferrans, V., Irani, K., Finkel, T.** (1995). Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Sience*, 270(5234), 296-299.

[88] **Karabulut, H., and Gülay, M.Ş.** (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Salık Bilimler Enstitüsü Dergisi,* 4(1).

[89] **Cheng, A., Wan, F., Wang, J., Jin, Z., Xu, X.** (2008). Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from Glycyrrhiza uralensis fish. *International Immunogharmacology*, 8(1), 43-50.

[90] **Yoon, S.-B., Lee, Y.-J., Park, S.K., Kim, H.-C., Bae, H., Kim, H.M., Park, W.** (2009). Anti-inflammatory effects of Scutellaria baicalensis water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *Ethnopharmacol*, 125(2), 286-290.

[91] **Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., Darley-Usmar, V.M.** (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimia et Biophysica-Bioenergenetics*, 1411(2-3), 385-400.

[92] **Morel, D.W., Hessler, J.R., and Chisolm, G.M.** (1983). Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *Journal of Lipid Reserach*, 24(8), 1070-1076.

[93] **Halliwell, B., and Chirico, S.J.** (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715-725.

[94] **Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.-Q. (**2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radical Biology and Medicide,* 32(12), 1264-1275.

[95] **Stadtman, E.R., and Levine, R.L.** (2000). Protein oxidation. *The Newyork Academia of Sience,* 899(1), 191-208.

[96] **Cooke, M.S., Dizdaroğlu, M., and Luence, J.** (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The Faseb Journal,* 17(10), 1195-1214.

[97] **Rees, M.D., Kennett, E.C., Whitelock, J.M., Davies, M.J.** (2008). Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radical Biology Medicine,* 44(12), 1973-2001.

[98] **Shahidi, F., and Naczk, M.** (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals.* CRC press.

[99] **Liu, Z.-Q.** (2010). Chemical methods to evaluate antioxidant ability. *Chemical Rewiws,* 110(10), 5675-5691.

[100] **Suja, K., Abraham, J.T., Thamizh, S.N., Jayalekshmyc, A., Arumughan, C.** (2004). Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry,* 84(3), 393-400.

[101] **Göger, F.** (2013). *Mentha Spicata L. alttürlerinin fenolik bileşikleri ve antioksidan aktivitelerinin YBSK-KS/KS yöntemi ile belirlenmesi.*(Doktora tezi). Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir.

[102] **Haigh, R.J.F.** (1986). Safety and necessity of antioxidants: EEC approach. *Food and Toxicology,* 24(10-11), 1031-1034.

[103] **Halliwell, B., and Gutteridge, J.** (1995). *Free radicals in biology and medicine.* Oxford.

[104] **Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., Salvatore, S., Serafini, M., Brighenti, F.** (2009). Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *International Journal of Food Siences and Nutrition,.* 60(2), 12-22.

[105] **Van Esch, G.J.V.** (1986). Toxicology of tert-butylhydroquinone. *Food and Chemical Toxicologh,* 24(10-11), 1063-1065.

[106] **Taner, G.J.B.T., ,** (2005). Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma. *Bilim Teknik,* 113, 453.

[107] **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yong, M., Rice-Evas, C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicana,* 26(9-10), 1231-1237.

[108] **Yılmaz, İ.** (2010). Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi,* 17(2), 143-153.

[109] **Bolland, J. and Ten Have, P.** (1947). Kinetic studies in the chemistry of rubber and related materials. IV. The inhibitory effect of hydroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate. *Transactions of the Faraday Society,* 43, 201-210.

[110] **Hatıpoğlu, S.D.** (2010). *Salvia adenophylla ve Salvia verticillata subsp. amasiaca Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin Aktivite Odaklı İzolasyonu Yarı Sentetik Türevlerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin İncelenmesi*. (Yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniverstesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[111] Madhavi, D.L., Deshpande, S., and Salunkhe, D.K. (1995). *Food Antioxidants Technological Toxicological and health perspectives.* CRC Press.
[112] Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., Yehoshua, Y. (2013). Natural antioxidants: function and sources. *Food and Sciences,* 4, 643-649.
[113] Pratt, D.E., and Hudson, B.J. (1990). Natural antioxidants not exploited commercially. *Food antioxidants,* 171-191.
[114] Brown, J.E. (1999). *Nutrition Now*. (2. bs). West/Wadswort, Belmont.
[115] Kelvin J, **Davies, K.** (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life,* 50(4-5), 279-289.
[116] Hasler, C.M. (2000). Plants as medicine: The role of phytochemicals in optimal health. *Phytochemicals and Phytopharmaceutical*s, 1-12.
[117] Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature,* 181(4617), 1199-1200.
[118] Miller, H.J. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society,* 48(2), 91-91.
[119] Cao, G., Sofic, E., Prior R.L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Food Chemistry,* 44(11), 3426-3431.
[120] Liu, F., Ooi, V. and Chang, S.J. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciencis,* 60(10), 763-771.
[121] Benzie, I.F., and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry,* 239(1), 70-76.
[122] Wayner, D., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. Febs Letters, 187(1), 33-37.
[123] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademli, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 52(26), 7970-7981.
[124] Meschini, S., Pellegrini E., Condella, M., Occhionero G., Delfine, S., Condello, G., Mostrodonato, F. (2017). Cytotoxic and apoptotic activities of *Prunus spinosa* trigno ecotype extract on human cancer cells. *Molecules,* 22(9), 1578.
[125] Pinacho, R., Cavero, K.Y., Astiasoran, I., Ansorene, D., Calvo, M.I. (2015). Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods,* 19, 49-62.
[126] Costa, P., Grevenstuk, T., Rosa Da Costa, A.M., Gonçalves. S., Romano, A. (2014). Antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Lavandula viridis* L.'Hér extracts after in vitro gastrointestinal digestion. *Industrial Crops snd Products,* 55, 83-89.
[127] Tavares, L., Figuera, I., Macedo, G., McDougall, G. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry,* 131(4), 1443-1452.
[128] Veličković, J.M., Kostic, D.A., Stojanovic, G.S., Mitic, S.S., Randelovic, S.S., Dordovic, A.S (2014). Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijsko Industrija,* 68(3), 297-303.

[129] **Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Veberic, R., Sircelj, H. (**2016). Wild *Prunus* fruit species as a rich source of bioactive compounds. *Food Science,* 81(8), C1928-C1937.

[130] **Koleckar, V., Katerina, K., Zuzona, R., Kamil, K., Danjel, J., Ludek, J., Lubomik, O.** (2008). Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini-Rviews in Medical Chemistry,* 8(5), 436-447.

[131] **Celik, F., Gündoğdu, M., Alp, S., Muradoglı, F., Ercişli, S., Gecer, M.K., Canan, I.** (2017). Determination of phenolic compounds, antioxidant capacity and organic acids contents of *Prunus domestica* L., *Prunus cerasifera* Ehrh. and *Prunus spinosa* L. fruits by HPLC. *Acta Chromatogrophica,* 29(4), 507-510.

[132] **Radovanović, B.C., Anđelkovićet, S.M., Radovanović, A.B., Anđelković, M.Z.** (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research,* 12(5), 813-819.

[133] **Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M.A.** (2017). Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: Phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Frontiers in Phormacology,* 8, 680.

[134] **Karakas, Okur, M.E., Ozturk, I., Ayla, S., Karadag, A.E., Polat D.Ç.** (2019). Antioxidant activity of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruit extract and cytotoxic effects on various cancer cell lines. *Medeniyet Medical Journal,* 34(3), 297.

[135] **Guimarães, R., Brros, L., Duenas, M., Carvalho, A.M., Queiraz, M.J., Santos-Buelga, C., Ferreirai I.** (2013). Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry,* 141(4), 3721-3730.

[136] **Şengül, M., Topdaş, E.F., Doğan, H., Seremcam, H.** (2018). Artvin İlinde Geleneksel Olarak Üretilen Bazı Marmelat Çeşitlerinin Çeşitli Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ile Antioksidan Aktiviteleri ve Fenolik Profillerinin Araştırılması. *Akademik Gıda,* 16(1), 51-59.

[137] **Stanković, M.I., Savieć, V.L., Zivkovi, J.V., Tadć, V.M., Arsić, I.A.** (2019). Tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of wild Prunus spinosa L. fruit extracts as natural source of bioactive compounds. *Notulae Botanicae Agrobotanici Cluj-Napoca,* 47(3), 651-657.

[138] **de AR Oliveira, de Oliveria, A.E., da Conceiçao, E.C., Leles, M.** (2016). Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary. *Food Chemistry,* 211, 465-473.

[139] **Hossain, M., Borry-Ryan, C., Martin-Diona, A.B., Brunton, N.p.** (2011). Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry,* 126(1), 339-346.

[140] **Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 152-178.

[141] **Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C.** (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food on Drug Analysis,* 10(3).

[142] Barros, L., Babtista, P., and Ferrira, I. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology,* 45(9), 1731-1737.

[143] Brahmi, N., Scognamiglio, M., Pacifico, S., Mekhoukhe, A., Madani, K., Fiorentino, A., Monaco, P. (2015). 1H NMR based metabolic profiling of eleven Algerian aromatic plants and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties. *Food Research International*, 76, 334-341.

[144] Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry,* 89(3), 411-420.

[145] Dragović-Uzelac, V., Levaj, B., Bursać, D., Padisić, S., Radojćić, I., Bisko, A. (2007). Total phenolics and antioxidant capacity assays of selected fruits. *Agriculturae Conspectus Scientificus,* 72(4), 279-284.

[146] Mishra, K., Ojha, H., and Chaudhury, N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry,* 130(4), 1036-1043.

[147] **Velioğlu, S.J.** (2000). Effects of natural antioxidants on human health. *Gıda,* 3, 167-77.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Elif VELİ BAYSAN

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimler Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü.

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Bezmialem Vakıf Üniversitesi BAP-4.2019/28 *Prunus spinosa* L. Türünün Meyve Ekstraksiyonundaki Fenolik Madde Ve Antioksidan Aktivitelerinin Yüzey Yanıt Metodolojisi İle Optimizasyonu. Araştırmacı, (2019-2020).
- İstanbul Üniversitesi TÜBİTAK-1170982 Pırnal Meşesinin (*Quercus ilex* L.) Türkiye'deki Yayılışı, Vejetasyon Yapısı Ve Ağaç Gelişiminin Saptanması Ve Farklı Yetişme Ortamı Koşulları İle İlişkilerinin Belirlenmesi. Bursiyer, (2020).