

T.C.

**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Anemone coronaria

**EKSTRAKTLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN VE BAZI
BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RUSİF YUSİFLİ

DENİZLİ, HAZİRAN 2019

T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



Anemone coronaria

EKSTRAKTLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN VE BAZI
BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RUSİF YUSİFLİ

DENİZLİ, HAZİRAN 2019

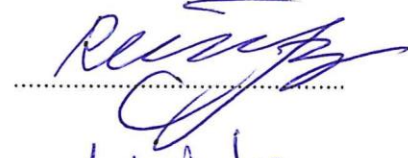
KABUL VE ONAY SAYFASI

RUSİF YUSİFLİ tarafından hazırlanan “*Anemone coronaria* EKSTRAKTLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN VE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 16.07.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Ramazan MAMMADOV



Üye
Prof. Dr. Şevki ARSLAN



Üye
Doç. Dr. İbrahim KIVRAK



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 2.4/27/2019 tarih ve 30/15... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
tarafından 2018FEBE054 nolu proje ile desteklenmiştir**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.



RUSİF YUSİFLİ

ÖZET

Anemone coronaria

EKSTRAKLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN VE BAZI BİYOLOJİK

ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RUSİF YUSİFLİ

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. RAMAZAN MAMMADOV)

DENİZLİ, HAZİRAN 2019

Bu çalışma, Ranunculaceae familyasına ait yumrulu bir bitki olan *Anemone coronaria* türünün etanol, aseton ve su ekstraktları üzerinde yapılmıştır. *Anemone coronaria* türünün yer altı ve yer üstü kısımlarının ekstraktlarının HPLC yöntemi ile fenolik içeriklerinin belirlenmesi, içerdikleri fenolik bileşenlerin, flavonoidlerin ve tanenlerin miktar tayinleri, antioksidan yöntemleri kullanarak β -Karoten, DPPH, ABTS, Cuprac, Fosfomolibdenyum, Metal şelatlama ve FRAP deneyleri yapılmıştır. Bunların dışında türün ekstraktlarının Tirozinaz enzimi üzerinde inhibe edici, *Artemia salina* üzerinde sitotoksik etkilerine, ev sineği (*Musca domestica*) ve sivrisinek (*Culex pipiens*) üzerinde ise larvasidal etkilerine bakılmıştır. Sonuç olarak en yüksek antioksidan etki yer üstü kısmının etanol ekstraktında 6.39 ± 0.12 mg/mL(IC₅₀), en düşük antioksidan aktivite ise yer üstü kısmının su ekstraktında 0.25 ± 0.06 mg/mL(IC₅₀) görülmüştür. En yüksek fenolik bileşen miktarı yer üstü kısmın aseton ekstraktında 68.33 ± 0.03 mg GAE/g, en yüksek flavonoid miktarı yer üstü kısmının aseton ekstraktında 118.42 mg QE/g, en yüksek tanen miktarı ise aseton yer üstü kısmında 55.49 ± 0.05 mg/mL olarak bulunmuştur. Bunların dışında türün ekstraktlarının enzim inhibe edici, sitotoksik ve lavrasidal etkilerinin olduğu da bu çalışmada deneylerle kanıtlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Antioksidan, HPLC, *Musca domestica*, *Culex pipiens*, Ranunculaceae, *Anemone coronaria*

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES AND

PHENOLIC COMPOUNDS OF *Anemone coronaria*

MSC THESIS

RUSİF YUSİFLİ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. RAMAZAN MAMMADOV)

DENİZLİ, JULY 2019

This study was carried out on ethanol, acetone and water extracts of *Anemone coronaria*, a tuberous plant belonging to Ranunculaceae family. Determination of phenolic contents of extracts of underground parts of *Anemone coronaria* species, quantification of phenolic compounds, flavonoids and tannins they contain, determination of antioxidant activity were performed. In addition to this, the inhibitory effects of the species extracts on tyrosinase enzyme, cytotoxic effects on *Artemia salina* and larvacidal effects on house fly (*Musca domestica*) and mosquito (*Culex pipiens*) and chemical content was analyzed by HPLC. As a result, the highest antioxidant effect was 6.39 ± 0.12 mg/mL(IC50) in the ethanol extracts of the surface and the lowest antioxidant activity was 0.25 ± 0.06 mg/mL(IC50) in the underground extracts. The highest amount of phenolic compounds was found in the acetone extract 68.33 ± 0.03 (mg/mL GAE/g) of the surface part, the highest amount of flavonoids was found in ethanol extracts of the surface part 118.42 (mgQE/g), and the highest amount of tannin was found in the acetone above ground extracts 55.49 ± 0.05 mg/mL. In addition, the enzyme inhibitor, cytotoxic and larvacidal effects of the extracts of the species were also proved by experiments in this study.

KEYWORDS: Antioxidant, HPLC, *Musca domestica*, *Culex pipiens*, Ranunculaceae, *Anemone coronaria*

İçindekiler

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1 <i>Anemone coronaria</i> Bitkisinin Botanik Özellikleri	3
1.1.1 Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller)	3
1.1.1.1 <i>Anemone</i>	3
1.1.1.2 <i>Anemone coronaria</i>	3
1.2 Sekonder Metabolitler	5
1.2.1 Serbest Radikaller	7
1.2.1.1 Serbest Radikal Kaynakları	9
1.2.1.2.1 Endojen Kaynaklı Olarak:	9
1.2.1.2.2 Eksojen Kaynaklı Olarak:	9
1.2.2 Antioksidanlar	10
1.2.2.1 Doğal Antioksidanlar	10
1.2.2.1.1 Vücudumuz Tarafından Sentezlenen Antioksidanlar.....	10
1.2.2.1.2 Vücudumuz Tarafından Sentezlenmeyen Antioksidanlar.....	11
1.3 Sentetik Antioksidanlar	15
1.3. 1 Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA).....	15
1.3.2 .Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT).....	16
1.3.3 Propil Gallat (PG).....	16
1.3.4 Tersiyer Bütihidrokinon (TBHQ)	17
1.4 Sentetik Antioksidanlar ve Doğal Antioksidanların Karşılaştırılması	17
1.5 Biyoinsektisit ve Bitkilerin Biyoinsektisit Etkileri	18
1.5.1 <i>Musca domestica</i> (Ev sineği)	18
1.5.2 <i>Culex pipiens</i> (Sivrisinek).....	19

1.6 HPLC.....	19
1.7 Tirozinaz Enzim İnhibitör Aktivitesi	19
2. YÖNTEM.....	20
2.1 Materyal	20
2.1.1 Çalışmada Kullanılan <i>Anemone</i> Türleri, Özellikleri ve Toplanması	20
2.1.2 Bitkisel Ekstraktların Hazırlanması	21
2.2 Yöntemler.....	23
2.2.1 Antioksidan Aktivite Yöntemleri	23
2.2.1.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	23
2.2.1.2 β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi	24
2.2.1.3 İndirgeme Gücü Kapasitesi (FRAP) Yöntemi	25
2.2.1.4 CUPRAC Yöntemi.....	25
2.2.1.5 ABTS Radikal Giderim Aktivitesi	26
2.2.1.6 Şelatlama Kapasitesinin Belirlenmesi.....	26
2.2.1.7 Fosfomolibdenyum Yöntemi.....	27
2.2.2. Miktar Tayin Yöntemleri.....	28
2.2.2.1 Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini.....	28
2.2.2.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini.....	28
2.2.2.3 Toplam Tanen Miktarının Belirlenmesi.....	28
2.2.2.4 YPSK (HPLC) Yöntemi İle Bitkideki Fenolik Bileşen İçeriklerinin Belirlenmesi.....	29
2.2.3 Enzim Deneyleri.....	29
2.2.3.1 Tirozinaz Enzimi İnhibitör Aktivite Yöntemi	29
2.2.4 Brine Shrimp Kullanarak Potansiyel Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	30
2.2.5 Bitki Ekstraktlarının Larvasidal Etkisi	30
2.2.5.1 <i>Musca domestica</i> (Ev Sineği) Üzerindeki Larvasidal Etkisi.....	30
2.2.5.2 <i>Culex pipiens</i> (Sivrisinek) Üzerindeki Larvasidal Etkisi.	31
2.2.6 İstatistik Hesaplamalar	31
3. BULGULAR	31
3.1 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi, İndirme Gücü ve Miktar Tayin Yöntemleri.....	31

3.1.1 Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin Belirlenmesine Yönelik Deney Sonuçları	31
3.1.2 İndirgeme Gücü Kapasitesine Yönelik Deney Sonuçları.....	33
3.1.3 İçerik Belirlenmesine Yönelik Deney Sonuçları.....	39
3.1.6 Bitki Ekstraktlarının Larvasidal Etkisi Deney Sonuçları	40
3.1.7 Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i>) Letalite Testi ile Bitki Ekstraktlarının Sitotoksik Etkisi Sonuçları	42
3.2 YPSK (HPLC) Yöntemi İle Standart Fenolik Bileşiklerin Analizi.....	45
3.1 Tirozinaz Enzim İnhibitör Aktivite Deneyi	53
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
5. KAYNAKLAR.....	62

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: <i>Anemone coronaria</i>	4
Şekil 2.1: <i>Anemone coronaria</i>	21
Şekil 2.2: <i>Anemone coronaria</i> blender yardımıyla toz haline getirilmiş hali	21
Şekil 2.3: Çalkalamalı su banyosu	22
Şekil 2.4: Rotary evaporatör	22
Şekil 2.5: Liyafilizatör	23
Şekil 2.6: DPPH radikalinin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 3.1: <i>Anemone coronaria</i> ekstraktlarının yer üstü (y.ü) ve yer altı (y.a) kısımlarının IC ₅₀ grafiği.....	32
Şekil 3.2: Su, etanol ve aseton ekstraktların yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının IC ₅₀ grafiği	33
Şekil 3.3: Troloksa ait kalibrasyon eğrisi.....	34
Şekil 3.4: Ekstraktların yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının Frap deneyinde farklı konsantrasyonlardaki absorbans grafiği	35
Şekil 3.5: Askorbik asite ait kalibrasyon eğrisi.....	36
Şekil 3.7: CUPRAC yöntemi farklı konsantrasyonlardaki absorbans grafiği.....	38
Şekil 3.8: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin su yer altı kısmının yüzde ölüm oranı grafiği	41
Şekil 3.9: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin su yer üstü kısmının yüzde ölüm oranı grafiği.....	41
Şekil 3.10: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin su yer altı kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği.....	42
Şekil 3.11: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin su yer üstü kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği.....	43
Şekil 3.12: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin etanol yer altı kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği.....	44
Şekil 3.13: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin etanol yer üstü kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği.....	44

Şekil 3.14: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin aseton yer altı kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği.....	45
Şekil 3.15: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin aseton yer üstü kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği.....	45
Şekil 3.16: Standart kromatogram	46
Şekil 3.17: Etanol yer altı ekstraktının YPSK kromatogramı.....	46
Şekil 3.18: Etanol yer üstü ekstraktının YPSK kromatogramı.....	47
Şekil 3.19: Gallik asit kalibrasyon grafiği	47
Şekil 3.20: 3,4 dihidroksi kalibrasyon grafiği.....	47
Şekil 3.21: 4-hidroksi kalibrasyon grafiği.....	48
Şekil 3.22: Klorojenik asit kalibrasyon grafiği.....	48
Şekil 3.23: Vanilik asit kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 3.24: Kafeik asit kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 3.25: p-Kumarik asit kalibrasyon grafiği.....	50
Şekil 3.26: Ferulik asit kalibrasyon grafiği.....	50
Şekil 3.27: Sinamik asit kalibrasyon grafiği.....	51
Şekil 3.28: 2,5-dihidroksi kalibrasyon grafiği.....	51
Şekil 3.29: Epikateşin kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 3.30: Rutin kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 3.31: Ellagik kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 3.32: Kuersetin kalibrasyon grafiği.....	53

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Reaktif Oksijen Türleri.....	8
Tablo 1.2: Reaktif Nitrojen Türleri.....	8
Tablo 3.1: Ekstraktların yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının IC ₅₀ değerleri...	32
Tablo 3.2: Bitki ekstraktlarının yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının IC ₅₀ değerleri.....	32
Tablo 3.3: <i>Anemone coronaria</i> türünün aseton, su, etanol ekstraktlarının yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının Frap deney sonuçları.....	34
Tablo 3.4: Ekstraktların yer altı ve yer üstü kısımlarının metal şelatlama kabiliyeti mg/mL.....	35
Tablo 3.5: Bitki ekstraktlarının yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının fosfomolibdenyum deney sonuçları	36
Tablo 3.6: <i>Anemone coronaria</i> yer altı ve yer üstü kısımlarının β-karoten-linoleik asit yöntemi.....	37
Tablo 3.7: Cuprac yöntemi ekstraktların yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının deney sonuçları.....	38
Tablo 3.8: Yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) ekstraktlarının fenolik madde miktarı.....	39
Tablo 3.9: Yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) ekstraktlarındaki flavonoid madde miktarları.....	39
Tablo 3.10: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) ekstraktlarının toplam tanen madde miktarı.....	40
Tablo 3.11: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin <i>M.domestica</i> larvalarına karşı ortalama ölüm oranlar (%) ve istatistiksel değerleri	40
Tablo 3.12: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin su yer altı, su yer üstü kısımlarının <i>A. salina</i> 'ya Karşı ortalama ölüm oranları (%) ve istatistiksel değerleri	42
Tablo 3.13: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin etanol yer altı ve yer üstü kısımlarının <i>A. salina</i> 'ya karşı ortalama ölüm oranları (%) ve istatistiksel değerleri	43
Tablo 3.14: <i>Anemone coronaria</i> bitkisinin aseton yer altı, yer üstü kısımlarının <i>A. salina</i> 'ya karşı ortalama ölüm oranları (%) ve istatistiksel değerleri	44

Tablo 3.15: Bitkinin etanol yer altı ve yer üstü ekstraktlarının bazı fenolik bileşen içerikleri	45
Tablo 3.16: Tirozinaz enzimi ekstraktların yer altı ve yer üstü kısımlarının (%) verileri	54

SEMBOL LİSTESİ

- A. coronaria** : *Anemone coronaria*
- R•**: Serbest Radikal
- DNA**:Deoksiribonükleik asit
- RNA** :Ribonükleik asit
- SOD** :Superoksit dismutaz
- CAT**:Katalaz
- GSH-Px** :Glutasyon Peroksidaz
- GSH-Red** : Glutasyon redüktaz
- TNF** : Tümör Nekroz Faktör
- GST**: Glutasyon S-transferaz
- O₂**:Süperoksit
- OH-** :Hidroksil
- H₂O₂**:Hidrojen Peroksit
- NO•**:Nitrik oksit
- ONOO⁻**:Peroksinitrit
- ROO**:Peroksi
- RO°**:alkoksil
- FCR**:Folin-Ciocalteu Reaktifi
- DPPH**:1,1-difenil-2-pikril hidrazil
- CUPRAC**: Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite
- FRAP**: Demir İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü
- YPSK (HPLC)** :Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
- BHA** :Bütillenmiş Hidroksi Anisol
- BHT** :Bütillenmiş Hidroksi Toluen
- PG** :Propil Gallat
- TBHQ** :Ter-Bütil Hidrokinon
- dH₂O**: Distile Su
- IgG**:İmmünglobülin G
- °C** : santigrat derece
- gr**: Gram
- mg** :milligram
- mL**:mililitre

M: Molarite

mm : Milimetre

µg: mikrogram

µl: Mikrolitre

% : Yüzde

WHO:Dünya Sağlık Örgütü

PEs:Prokateşol eşdeğeri

TEs:Troloks eşdeğeri

QEs:Kuersetin eşdeğeri

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda yardımlarını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmamı daha kolay yürütebilmemi ve bitirebilmemi sağlayan, danışmanım sayın Prof. Dr. Ramazan MAMMADOV'a, deneylerde ve bu tezi yazarken bana yardımcı olan doktora öğrencileri Özge Kılınçarslan Aksoy'a, Nahide Deniz'e, Akgül Rakhimzhanova'ya, tez süresince larvasidal deneyleri ve tezin yazımında noktasından virgüline kadar hatalarımı düzeltmeme yardımcı olan Murat Turan'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmayı maddi yönden destekleyen Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım. Bu tezin hazırlanmasında bana maddi ve manevi en büyük desteği sağlayan aileme şükranlarımı sunarım.

1.GİRİŞ

Doğada türünü ve sayısını bilmediğimiz binlerce bitki bulunmaktadır. Çok eski çağlardan beri insanlar bu bitkilerin tedavi edici ve zehirli bitkiler olarak tanımlanıp kullanılmaya başlanılmıştır. Son yıllarda hız kazanan bu araştırmalar çok sayıda bitkilerin insan sağlığına olan yararları belirlenerek tedavide ilaç, gıda ve şifa olarak kullanılmaya başlanılmıştır. Bu nedenle anason, haşhaş, kimyon gibi çok sayıda bitkilerin tarımı yapılmaktadır. 20. yüzyılın başlarından listelenen ilaçların yüzde %40'ından fazlası bitkisel olmasına rağmen 1970'li yılların ortasında bu oran %5' ten daha aşağıya düşmüştür. Ancak 1990'lı yıllardan sonra bitkilerin yeni kullanım alanların bulunması doğal ürünlere olan talebin gittikçe artmasına neden olmuştur (Kumar 2009).

Dünya Sağlık Örgütü son yıllardaki verilerine göre 20.000 den fazla bitki türü tıbbi amaçla kullanılmaktadır (Baser 1997; Lange 2006). Ülkemiz coğrafi konumu, iklim ve bitki çeşitliliği, geniş yüz ölçümü, tarımsal potansiyeli tıbbi bitkiler ticaretinde önde gelen ülkelerdendir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler terimi genelde birlikde kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler hastalıkların önlemek, iyileştirmek ve sağlığı sürdürmek için ilaç olarak kullanılmaktadır. Aromatik bitkilerin parfümeri ve kozmetik sektöründe geniş olarak kullanım alanları mevcuttur (Anonim 2005).

Bitkisel ilaç, içinde birden fazla işlenmiş ve ya işlenmemiş bitki bileşimi maddesi içeren tedavi edici özelliği, hastalıkları önleyici ve insan sağlığına yararlı olan bitkilerden türetilen ürünlerdir. Bu tanımlama altında, bitkisel ilaçların işlenmemiş bitkisel materyal, işlenmiş bitkisel materyal ve tıbbi şifalı ot (herbal) ürünleri olmak üzere 3 çeşidi bulunmaktadır (Van Overwalle 2007).

20. yüzyılın başlarında incelenen ilaç listelerinin %40'ından fazlası bitkisel kökenli iken sonraki dönemlerde kullanımı azalmıştır bunun nedeni teknolojinin getirdiği yenilikler, sosyal ve politik değişimler olmuştur. 1980-1990. yıllarda gelişmiş ülkelerde bitkisel ürünlere olan ilgi doğal ürünlerin kullanımını arttırmıştır (Baser 1998).

Günümüzde bitkiler tıbbi, baharat, tatlandırıcı, koku ve süs olarak kullanılmaktadır.

Ülkemizde süs bitkilerin kullanımı Osmanlı dönemine dayanmaktadır. Dünya pazarında süs bitkileri sektörü başında gelen ülkeler Hollanda, ABD ve Japonya'dır. Ülkemizde bu sektörde 27.sıradadır. Türkiyede süs bitkilerinin yetiştirildiği başlıca şehirler Yalova, İzmir, Antalya ve çevresindeki şehirlerdir. Süs bitkileri dört alt grupta incelenmektedir: kesme çiçekler, iç mekan, dış mekan ve doğal çiçek soğanları (geofitler). Ülkemiz geofit bitkiler açısından da çok zengindir. Geofit bitkiler yer altı kısımları değişime uğramış rizom, soğan, tuber yapısını alarak depo özelliği kazanmış bitkilerdir (Anonim 2001).

Ülkemizde 73 cinse bağlı 816 geofit türü bitki yetişmektedir (Seyid 2013). Genel olarak bu bitkiler Karadeniz, Akdeniz, Ege ve Toros bölgelerinde yayılış göstermektedir (Şekeroğlu 2012).

Genel olarak geofitler Liliaceae, Amaryllidaceae, Ranunculaceae, Iridaceae, Primulaceae, Araceae, Geraniaceae ve Orchidaceae familyalarında yer almakta çoğunluğu ekonomik ve tıbbi önem taşıyan türler içermektedir (Başköşe 2012). Geofit bitkiler gövdelerinin yer altında olması ile olumsuz hava koşullarında diğer bitkilere oranla daha dayanıklılık göstermektedirler (Baytop 1999).

Geofitler tıbbi, aromatik olarak kullanılmakla yanı sıra süs bitkisi olarak kullanılan tür bitkileride bulunmaktadır. Çalışması yapılan *Anemone coronaria* bitkisi geofit bir bitki türüdür.

1.1 *Anemone coronaria* Bitkisinin Botanik Özellikleri

1.1.1 Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller)

Ranunculaceae familyası 55 cins ve 2200 tür içerir. Bunlardan yaklaşık 20 cins ve 1200 türü endemik olarak bilinmektedir. Bu familyada bulunan bitkiler Kuzey yarımkürenin ılıman ve soğuk yerlerinde yayılış göstermektedirler. Ülkemizde zehirli bitkilerinde bulunduğu 17 cins ve 234 türü bulunmaktadır (Nezahat 2009). Familyanın üyeleri genellikle otsu ve nadiren odunsu bitkilerdir. Bazı türlerinden uyuşturucu madde ve süs bitkisi olarak yararlanılmaktadır. Çiçekleri ovaryum üst durumlu , erdişi ve ışınsaldır. Çiçek örtüsü tek sıralı ve ya iki sıra üzerinde dizilidir. Korolla ve kaliks bazen ayırt edilemez. Stamenler çevreden merkeze doğru çok sayıda spiral dizilişlidir. Anterler dışa yönelimli yapıdadır. Dişi organ, apokarp, nadiren tek karpelli ve birleşiktir. Meyve aken ve folikül, çiçeklenme durumu çok çeşitlidir. Tohumlar küçük ve yağ dokulu besidokuya sahiptir (Davis 1965 ; Seçmen 1995).

1.1.1.1 *Anemone*

Genellikle dağınık alanlarda, kuzey yarım kürenin serin ve ılıman bölgelerinde yaygın 60 kadar türü bulunmaktadır. *Anemone* cinsinin ülkemizde 8 türü ve 12 taksonu bulunmaktadır. Genel olarak ülkemizde Aydın, Antalya, Muğla, Denizli ve İzmir bölgelerinde doğal olarak bulunmaktadır. Renkli çiçeklere sahip çok yıllık otsu bitkilerdir. Çiçekleri simmetrik, tek veya şemsiye durumlu çiçeklerde çanak yapraklar 4-5 adet veya daha fazla, taç yaprak gibi renklidir. Çiçek sapı üzerinde el parmakları şeklinde parçalı ve onu çevreleyen bir yaprak oluşumuna sahiptir. Yapraklar sadece köke yakın kısımlardadır. Kök yapısı kazık ve rizom tipindedir (Davis 1965; Seçmen 1995).

1.1.1.2 *Anemone coronaria*

Ana vatanı Ege denizi kıyılarıdır. İlıman iklim kuşaklarında yetişmektedir. Çiçeklenme zamanı nisan ve mayıs aylarıdır. Çok yıllık, yumrulu köke sahip, 20-35 cm boylanan bitkidir. Yaprak kenarları dişli ve damarlıdır. Çiçekleri mavi, mor, kırmızı, pembe, karışık ve sade renkleri olanlarıda vardır. Çiçekleri sürgün ucunda

tek olarak bulunmaktaadır. Meyvesi kapsül ve üzüksü biçimdedir (Davis 1965; Seçmen 1995).



Şekil 1.1: *Anemone coronaria*

Âlem: Plantae

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Takım: Ranunculales

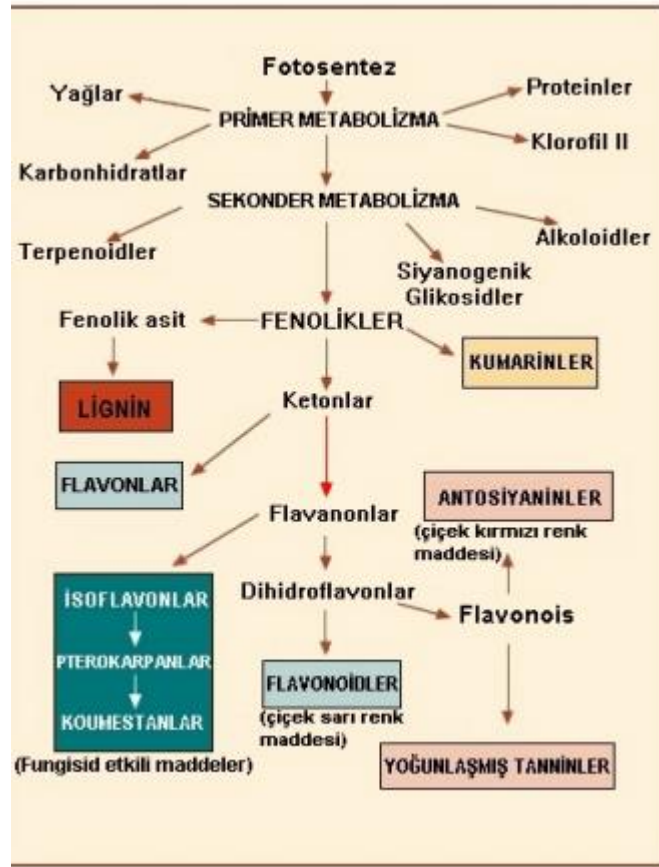
Familya: Ranunculaceae

Cins: *Anemone sp.*

Tür: *A. coronaria*

1.2 Sekonder Metabolitler

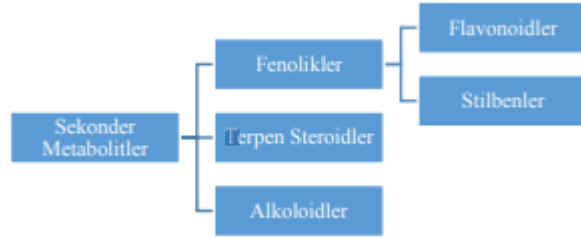
Son yıllarda bitkilerin çevreye adaptasyonunda, herbivorlara, otçulara ve mikroorganizmalara karşı savunmalarında rol oynayan bu moleküllerle ilgili araştırmalar artmaktadır. Bu nedenle ki bu molekullar bitkinin hayatını devam etmesi açısından önem arz etmektedir. Bitkilerin temel fonksiyonlarını devam etmesinde primer metabolitler, sekonder metabolitler ise primer metabolitlerden biyosentetik yolla üretilmiştir.



Şekil 1.2: Sekonder metabolit ve primer metabolit ilişkisi

Biyolojide ikincil metabolit kavramını Kossel'e atfedilebilir. Bu metabolitleri birincile göre tanımlayan ilk bilim insanıdır (Bourgaud 2001). Bundan otuz yıl sonra önemli bir adım Czapek tarafından yapıldı ona göre sekonder metabolitler ikincil modifikasyon dedikleri şeyden türemiş olabilirler (Czapek 1921). Günümüzde biyoteknolojinin ilerlemesi ile bu moleküllerin bitkilerin çevreye adaptasyonunda önemli rol oynadıkları ortaya konmuştur. İkincil metabolitler antimikrobiyal, antifungal ve antiviral olarak tanımlanmış birleşikleri kullanarak

patojenlere, çevresel etkilere, stres ortamlarına, herbivorlara karşı bitkileri korur. Sekonder metabolitler genel olarak biyosentetik yolla üç büyük molekül ailesine ayrılmaktadır. Bunlar terpenler, fenolikler ve alkaloidlerdir (Mammadov 2014).



Şekil 1.3: Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması

Fenolikler çoğunlukla pigmentlerle temsil edilen bütün bitkilerde bulunan bir gruptur. Bu grupta yaygın olarak lignin sentezinde yer alan moleküller bulunur ki, bu da tüm yüksek bitkiler için yaygın bir madde olarak kabul edilir. Kimyasal olarak asidik hidroksil grubu içeren aromatik birleşiklerdir (Mammadov 2014).

Alkoloidler bitkiler aleminde daha seyrek dağılım gösterir ve tanımlanmış bitki cinsi ve türlerine göre spesifiktir. Sekonder metabolitlerin böyle bir dar dağılımı kemotaksonomi ve kimyasal ekolojinin temelini oluşturur. Yüzyıllar boyu insanlar alkoloidleri zehir, büyü, tedavi edici, ağrı kesici ve çeşitli maksatlar için kullanmışlardır. Bitkilerde alkoloidler, herbivorlara, sineklere ve mikroorganizmalara karşı savunmada görev alır. Genellikle özelleşmiş dokularda ve hücrelerde üretilerek depo alanlarına transfer edilir. Bazı bitkiler birden fazla alkoloid sentez edebilir (Mammadov 2014).

Terpenler beşli karbon birimlerine göre sınıflandırılır: hemimer (C₅), monoterpen (C₁₀), seskiterpen (C₁₅), diterpen (C₂₀), triterpen (C₃₀), tetraterpen (C₄₀) ve politerpenler (C₈₀) biriminden. Bitkiler glandular trikomalara, epidermis ve salgılamaya kavimler gibi özelleşmiş dokulardan çeşitli terpenoidler üretmektedirler (Alvarez 2014).

Yüzyıllardır ikincil metabolitlerden büyük biyolojik aktiviteleri nedeniyle geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Günümüzde eczacılıkta ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadır. Son yıllarda batılı ülkelerde kullanılan ilaçların % 25'inin bitkisel kökenli olduğu ortaya konulmuştur. Örnek olarak kaynağı söğüt ağacı olan aserilsalislik içerikli aspirin verile bilir (Payne 1991).

1.2.1 Serbest Radikaller

Serbest radikaller eşleşmemiş elektronu olan birçok fizyolojik ve patolojik reaksiyonlar sonucunda oluşan reaktif moleküllerdir. Genel olarak R• simgesi ile gösterilmektedir. Bu moleküller protein, lipit ve nükleik asit gibi önemli molekülleri tahrip ederek reaksiyonlar başlata bilirler. Serbest radikaller pozitif, negatif ve nötr ola bilirler. Serbest radikaller eşleşmemiş elektronlar bulundurduklarından dolayı diğer maddelerle kolayca reaksiyona gire bilirler. Serbest radikallerin yararlı ve zararlı tarafları vardır. Düşük yoğunlukta kanser hücrelerinin öldürülmesi, enfeksiyonlara karşı savunma fonksiyonları ile birlikte intrasellüler depolardan kalsiyum salınımı ve bazı hücrel sinyallerin aktivasyonunda rol oynamaktadır (Turan 2016).

Zararlı serbest radikal türevleri canlı organizmada anabolik ve katabolik yıkıma neden olmaktadır. Sağlıklı bir organizmada bu durum bir denge içerisinde. Bu denge bozulduğunda birçok hastalıklar ortaya çıkmaktadır ve bu durumda oksidatif stres denilmektedir. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen türevli ola bilirler. Oksijen türevli serbest radikaller ROS, nitrojen türevli serbest radikaller RNS olarak isimlendirilir. Reaktif nitrojen türleri arasında nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO₂), oksijen türevleri arasında ise süperoksit (O₂⁻), hidroksil (OH), peroksil (ROO), lipit peroksil (LOO), ve alkoksil (RO) radikalleri sayılabilir (Halliwell ve Gutteridge 1999; Valko ve diğ. 2007).

Tablo 1.1: Reaktif Oksijen Türleri

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit	O_2^-	Hidrojen peroksit	$H_2 O_2$
Hidroksil	OH^-	Hipokloröz OCL	
Peroksil	ROO^-	Hipobromöz	HOBr
Alkoksil	RO^-	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil	HO_2^-	Ozon	O_3
Lipid peroksil	LOO^-		

Tablo 1.2: Reaktif Nitrojen Türleri

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Nitrik oksit	NO	Nitrik asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	NO_2	Nitroksil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetraoksit	N_2O_4
		Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^+$
		Peroksinitrik asit	$ONOOH^-$
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2CL
		Alkil peroksinitrit	ROONO

1.2.1.1 Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller organizmamızda hem eksojen hem de endojen kaynaklı olabilir. Metabolizmamızın iç dengesinin bozulmasıyla hücrelerimizde ve çevresel etkenlerin nedeni ile sürekli olarak serbest radikaller üretilmektedir.

1.2.1.2.1 Endojen Kaynaklı Olarak

- 1) Lipit peroksidasyonu, ksantin oksidasyonu ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan
- 2) Vücut yoğunluğundan ve zihinsel streslerden kaynaklanan toksik serbest radikaller üretebilir
- 3) İmmun sistemi patojenlere karşı oksidatif radikaller üretebilir
- 4) Yangı durumunda sitokinler serbest kalır ve makrofajlar, nötrofiller serbest radikalleri üretmeye başlar (Hayrullah 2016).

1.2.1.2.2 Eksojen Kaynaklı Olarak

- 1) Sigara, egzoz dumanı ve alkol kullanımı
- 2) Gamma, UV ışınları
- 3) Volkanik faaliyetler
- 4) Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması
- 5) Temizlik ürünleri, parfümler, boyalar ve günlük yaşantımızda kullandığımız kimyasal ürünler (Hayrullah 2016).

Serbest radikaller hücreler olarak lipitler, proteinlere, karbonhidratlar ve DNA da hasar oluşturmaktadır. Lipitler serbest radikal hasarına karşı son derece hassastır. Serbest radikaller lipitler ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna şekillendirir. Şekillenen lipit peroksidasyonundan kaynaklanan hasar hücrenin fonksiyonu için son derece zararlıdır. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesini amino asit içerikleri belirler. Serbest radikaller DNA da oksidatif hasara yol açmaktadır. Hidroksil gibi serbest radikaller karbonhidratlar bir hidrojen atomunu çıkararak karbon merkezli radikal üretirler (Devasagayam ve diğ. 2004).

1.2.2 Antioksidanlar

Serbest radikallerin vücudumuzda oluşturabilecek zararlarını önlemek için antioksidanlar kullanılır. Antioksidanlar serbest radikalleri ortadan kaldıran, temizleyen ve hücrel hasarı önleyen maddelerdir. Bu maddeler ya vücudumuz tarafından doğal olarak üretilir yada dışarıdan ilave olarak alınırlar. Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar savunma sistemimizin etkisini artırarak hastalık riskini azaltırlar (Shinde ve diğ. 2012). Antioksidanlar reaktif oksijen türlerini engelleyen, detoksifikasyonunu engelleyen oluşturabilecek hasarları önleyen savunma mekanizmaları olarak tanımlanabilir (Şener ve diğ 2009). Serbest radikallere baskılıyıcı, onarıcı, enzimatik, zincir kırıcı, hücrel olarak etki mekanizmaları vardır. Antioksidanlar doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.2.2.1 Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki gruba ayrılır. Eksojen kaynaklı antioksidanlar vücudumuz tarafından üretilmeyen bitkilerden, meyvelerden ve sebzelerden gıda olarak kabul ettiklerimizden aldığımız maddelerdir. Endojen kaynaklı antioksidanlar vücudumuzun savunma mekanizmaları tarafından üretilen maddelerdir ve bu maddeler enzimatik, nonenzimatik olarak ikiye ayrılmaktadır (Yavaşer 2011).

1.2.2.1.1 Vücudumuz Tarafından Sentezlenen Antioksidanlar.

a) Enzimatik antioksidanlar

Vücudumuzun savunma sistemi tarafından üretilen antioksidan maddelerdir. Bu maddeler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon reduktaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz, hidroperoksidaz, glutatyon-S-Transferaz (GST) (Şener ve diğ 2009).

b) Enzimatik olmayan antioksidanlar

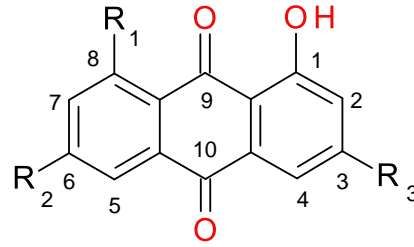
Enzimsel olmayan antioksidanlar arasında melatonin, seruloplazmin, transferrin, myoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin, albumin sayılabilir (Şener ve diğ 2009).

1.2.2.1.2 Vücutumuz Tarafından Sentezlenmeyen Antioksidanlar

Karetonoidler (likopen, beta karoten, lutein), fenolik birleşikler ve vitaminler (A,C,D, ve B grup vitaminleri) vücutumuz tarafından sentez olunmayan antioksidanlardır.

a) Fenolik bileşikler

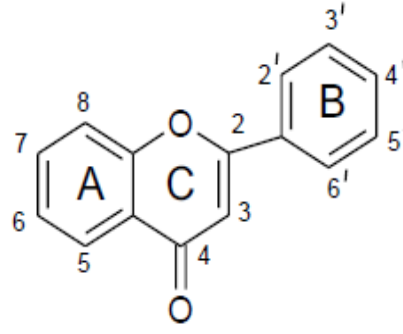
Bütün bitkilerde bulunan çoğunlukla pigmentlere temsil edilen antioksidanların büyük bir grubunu oluşturur. Kimyasal olarak fenolik birleşikler aromatik bir benzen halkasına bir hidroksil grubu eklenmesiyle oluşan fenol ve piron halkalarını taşıyan benzo- γ -piron türevleridir. Bu gruba lignin gibi hücre duvarını güçlendiren, bitkiyi koruyan, tozlanmada, tohum gelişiminde görev alan bileşikler bulunmaktadır. Fenolik bileşikler bir benzen halkası içeren bitkiyi stres ortamlarına karşı koruyan savunma mekanizması tarafından oluşturulan sekonder metabolit türüdür (Alasalvar ve diğ 2001). Bu birleşikler yapılarından dolayı polifenoller olarak adlandırılır. Polifenoller meyve ve sebzelere renk vermek aynı zamanda ağızda buruk bir tat bırakma yönünden bir kısmı daha çok etkilidir .Antioksidan özellikleri demir indirgeme ve serbest radikalleri bağlama gücüne dayanmaktadır (Cemal ve Recep 2014). Günlük yaşantımızda tükettiğimiz sebze, meyve ve içeceklerin içeriğinde bulunan fenolik madde alınımı 50-800 mg olarak değişmektedir (Pietta P-G 2000).



Şekil 1.4: Antrakinon yapısı

b) Flavonoidler

İnsan vücudunda sentezlenemeyen antioksidan ve şelatlama özelliğine sahip, hidroksil ve peroksil radikallerinin süpürücüleridir. Bitki ekolojisinde sarıdan kırmızıya hatta koyu mora kadar renk verme gibi farklı rollere sahiptir. Vücutumuzda enzim aktivitelerini düzenleyici, serbest radikal süpürücü, antibiyotik, antialerjik, ishal ve iltihap önleyici ilaç olarak önem taşımaktadırlar (Çapanoğlu ve Boyacıoğlu 2009).



Şekil 1.5: Flavonoidin kimyasal yapısı

Flavonoidler on beş karbon atomunu kapsayan C₆-C₃-C₆ konfigürasyonunda düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Yapı iki fenil (A ve B halkaları) halkası ile bağlı olan üçlü bir karbon köprüsüden (C halkası) oluşur. Bu bileşenler çoğu kez 3, 5, 7, 2', 3', 4', 5' pozisyonlarında hidroksillenmişlerdir. Renklerinin sarı olması ile latince sarı anlamına gelen “flavus” sözcüğünden türetilerek flavonoid adını almışlardır. Fenolik bileşenlerin en yaygın gruplarından. Flavonoidlerin büyük bir kısmına flavon ve flavan türevleri gibi bakılabilir. Farklı gruplar altında olan bu maddelerin tümünü bitkilerden sentez olunma özellikleri birleştirmektedir. Flavan bileşenleri kateşin, antosiyanidin ve proantosiyanidin; flavon türevleri ise flavonlar, izoflavonlar, flavononlar ve flavonoller gibi en önemli grupları içermektedirler (Mammadov 2014).

Antisiyanidin pigmentler arasında en baskını siyanidin türevleri ardınca delfinidin, peonidin, pelargonidin, petunidin ve malvidin türevleri onu izlemektedir. (Oomah ve Mazza 1999).

Flavonlar C₃ karbon atomuna hidroksil grubunun eklenmesiyle oluşan açık sarı renkli bileşiklerdir. Başlıca flavonlar apigenin, luteolin, tangeritin, krusin, baikalein, skutellarein, vagonin'dir (Turgay ve diğ 2017) .

Flavanonların C halkasında doymamış bir karbon - karbon bağına sahiptirler. Yapılarını dayanıksız dihidro- γ -piron halkası oluşturur. Bu nedenle flavanonlar baz ve asitlerin etkisi ile parçalanarak uygun kalkanlara dönüşürler. Flavanon yapısında bir asimetrik karbon atomu bulunduğundan, iki optik izomer ya da rasem karışım

halinde bulunurlar. Flavanonlar genelde kalkonlarla birlikte, çoğunlukla da glikozitlenmiş halde bulunurlar. Bu güne kadar 50'den fazla flavanon bitkilerden izole edilerek teşhis edilmiştir. Aglikon ve glikozitler olarak doğada bulunurlar (Mammadov 2014).

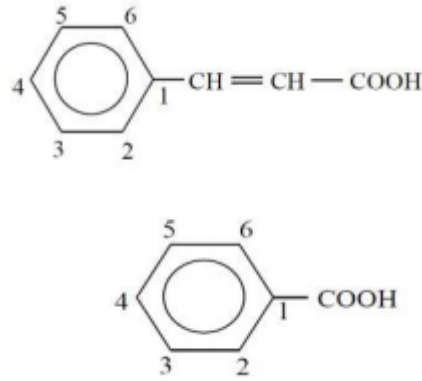
Kateşinler hemen hemen her meyvede bulunan renksiz bileşiklerdir. Havadaki oksijen ile reaksiyona girerek reaksiyon sonucu oligomer ve polimerlere kondense olarak proantisiyonidinleri oluştururlar. Kimyasal yapısında C₃ hidroksi grubu içerdiğinden flavan-3-ol olarak adlandırılırlar (Turgay ve diğ 2017) .

Tablo 1.3: Antioksidanların sınıflandırılması

Endojen Antioksidanlar	
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar
Superoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon Koenzim Q10
Katalaz (CAT)	Melatonin Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GP _x)	Ürik asit α-lipoik asit
Glutasyon reduktaz (GR)	Bilirubin Transferrin
	Albümin Seruloplazmin
Eksojen Antioksidanlar	
Vitamin Eksojen Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar
α – tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri
β-karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
	Nötrofil adezyon inhibitörleri
	Sitokinler (TNF ve IL-1))
	Barbitüratlar
	Demir şelatörleri

c) Fenolik asitler

Fenolik asitler benzoik asitin türevleridir. Bitkilerin yapısında yaygın şekilde bulunmaktadır. Serbest halde bulunmayan fenolik asitler sinamik asit ve benzoik asitlerin hidroksillenmiş türevleridirler. En yaygın hidroksisinnamik asit türevleri p-kumarik, kafeik ve ferulik asit'lerdir. Hidroksibenzoik asit türevleri genelde gıdalarda glikozid formunda bulunmaktadır. Hidroksisinnamik asitler çoğunlukla asit türevleridir. Hidroksil grubunun fenilpropan halkasına bağlandığı konumu ve sayısına farklı özellikler gösteren: ferulik asit, kafeik asit, o-kumarik asit ve sinapik asit türevleri ön plana çıkmaktadır. Hidroksibenzoik asitler hidroksisinnamik asitlerin β oksidasyonu ile oluşur. En çok bilinen hidroksibenzoik asit türevleri: salisilik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, siringik asit, gallik asittir (Turgay ve diğ 2017).



Şekil 1.6: Sinamik asit ve benzoik asit yapısı

d) Tanenler

Çay, bakla gibi bitkilerden elde edilen açık sarı, kahverengi toz şeklinde biçimsiz tannik asit olarak bilinen polifenolik birleşiklerdir. Genellikle kök, odun, kabuk, yaprak ve meyvelerinde bulunur. Bitkileri donmaktan ve kök dokusunda yerleşenler bitki patojenlerinden korur. Hayvanlar için faydalı olabilecek seviyelerden ölümüne yol açabilecek seviyelere kadar değişiklik göstermektedir.

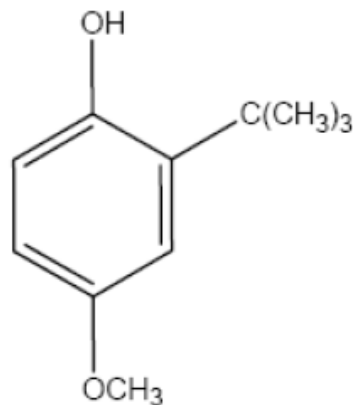
Tanenler , meşe palamudunda ve çayda bol miktarda bulunmaktadır. Moleküller yapılarına göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Hidrolize olabilen ve hidrolize olamayan bileşikler. Hidrolize olabilen tanenler merkezde karbonhidrat ve fenolik gruplarla esterleşmiş hidroksil grupları içerirler. Hidrolize olamayan tanenler (proantisiyonidinler) kimyasal yapılarından dolayı kondanse tanenler olarak bilinirler. Proantisiyonidinler asidik alkol çözeltilerinde ısıtılmasıyla kırmızı antosiyanidin oluşumuna neden olan oksidasyon reaksiyonunu katalizler. Reaksiyon sonucu üretilen antosiyanidinlerden en çok bilinenlerisiyanidin ve delfinidin'dir (S. Aslı ve Fulya 2007).

1.3 Sentetik Antioksidanlar

Biyomolekülleri oksidatif hasardan koruyan besinlerdeki istenmeyen koku ve tat oluşumunu engelleyen antioksidan özelliği yüksek bileşiklerdir. Sentetik antioksidanlar doğal antioksidanların en etkin analogunu taklit edecek şekilde geliştirilirler. Endüstride daha çok sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Propil gallat (PG) ve ter-bütül hidrokinon (TBHQ) verilebilir.

1.3.1 Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA)

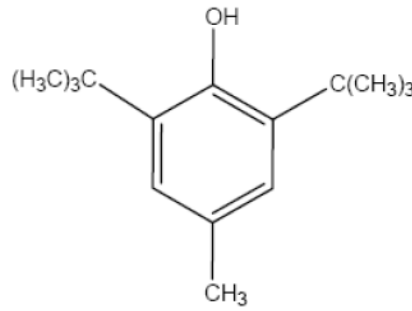
Hayvansal ve bitkisel yağlarda çözüne bilen, beyaz mumsu bir yapıya sahip kimyasal olarak iki izomerin (2- tersiyer-bütül-4-hidroksianisol ve 3-tersiyer-butül-4-hidroksianisol karışımı; C₁₁H₁₆O₂), karışımından ibaret olan antioksidan olarak tanımlanmaktadır (Wanasundra 1998). Özellikle uçucu yağların renk, tat ve kokularının korunmasında, kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonun kontrol etmede etkilidir.



Şekil 1.7: Bütilenmiş hidroksianisol (BHA) kimyasal yapısı

1.3.2 .Bütilenmiş Hidroksitoluen (BHT)

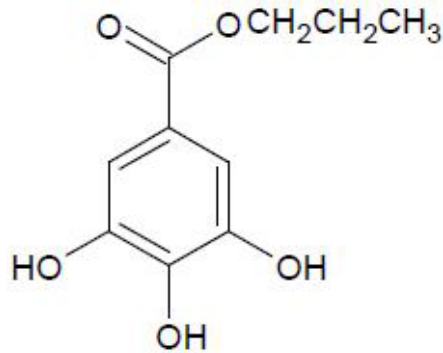
En çok kullanılan sentetik antioksidandır. İlk olarak soya yağının otoksidasyonunda bozunma ürünleri tayin edilerek fark edilmiştir. Daha çok hayvansal yağlarda ve etlerde etkilidir (Özkan 2000).



Şekil 1.8: Bütilenmiş hidroksitoluen (BHT) kimyasal yapısı

1.3.3 Propil Gallat (PG)

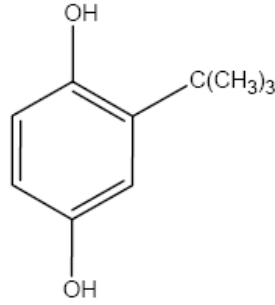
Beyaz ve kokusuz toz halde bulunan,yiyeceklerin medikal preparatların tazeliğini, besin değerini, aromasını,renğini korumak ve dengelemek için yaygın olarak kullanılan bir antioksidandır. Gıdalarda kullanımını 1947'den beri yaygınlaşmış toplum sağlığı ve gıda hijyeni açısından olumsuz hiçbir bilgi ileri sürülmemektedir (Asiye 2009).



Şekil 1.9: Propil gallat (PG) kimyasal yapısı

1.3.4 Tersiyer Bütildidrokinon (TBHQ)

Kızartma yağlarını oksidasyona karşı korumak için bej renkli toz şeklinde sentetik antioksidan olarak bilinmektedir. Katı ve sıvı yağlarda çözünür, yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır (Keskin ve Erkmn 1987).



Tersiyer Bütıl Hidrokinon
(TBHQ)

Şekil 1:10 Tersiyer bütildidrokinon (TBHQ) kimyasal yapısı

1.4 Sentetik Antioksidanlar ve Doğal Antioksidanların Karşılaştırılması

Son dönemlerde sentetik antioksidanların toksisite gösterebileceğini, kanser oluşumunu destekleyici etkileri doğal antioksidanlara olan ilginin artmasına sağlamıştır. Çünkü doğal antioksidanlar hem ekonomik hem de daha fazla antioksidan aktivite etkisi gösterir. Günümüzde sentetik antioksidanların zararlı etkilerinden dolayı kullanımları yasal olarak sınırlandırılmaktadır. Ayrıca sentetik antioksidanlar akciğer, bağırsak hastalıklarına neden olduğu ve karsinojenik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Sentetik antioksidanların zararlı etkilerinden dolayı son zamanlarda doğal antioksidanlara ilginin artmasına daha çok doğal ürünlerin tercih edilmesine bitkilerin üzerindeki antioksidan çalışmalarının artmasına neden olmuştur.

Yiyecek olarak kullandığımız gıdalarda temel olarak antioksidanların sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- Yüksek sıcaklık uygulamalarında etkilerini kaybetmemelidir
- Küçük miktarlarda kullanılmalı

- İnsan sağlığı için zararsız olmalı
- Gıdaların tat, görünüş ve doğal kokusunu bozmamalı (Sezgin 2006).

1.5 Biyoinsektisit ve Bitkilerin Biyoinsektisit Etkileri

Bitkilerin zararlıların saldırılarından kendilerini korumak için zararlıların sinir sistemi fonksiyonlarını bozarak ölümlerine neden olan ya da çoğalmalarını durduran çeşitli savunma sistemlerine sahiptir. Bu birleşikler insektisitler olarak tanımlanmaktadır. Bu birleşiklerin etki şiddetleri büyük ölçüde değişiklik göstermektedir (Ünver 2015).

Sekonder metabolitler bitkilerin biyokimyasal olaylarından sonra sentezlendiği için bitki zararlı ilişkilerinde önemli rol oynarlar. Bu metabolitlerin zararlılar üzerinde gösterdikleri etkilerinden dolayı sınıflandırılmaktadırlar. En önemlilerinin alkoloidler, glikozidler, fenoller, terpenoidler, tanenler ve saponinler olduğu belirtilmiştir. Gelişmiş ülkelerde bu maddelerin tarımda dolaylı veya doğrudan kullanımı önemli yer tutmuştur (Isman 1997).

Son zamanlarda bilinçsizce sentetik insektisitlerin kullanımı zararlılarda oluşan dayanıklılık ve çevreye toksisitesi gibi olumsuz etkileri doğel insektisitlere ilgiyi artırmıştır. Bitkilerin, potansiyel insektisit kaynağı olduğu birçok araştırmacılar tarafından ispatlanmıştır. Bitkisel kökenli insektisitlerin avantaj ve dezavantajları da vardır. Doğel olarak çok sayıdaki bitkinin insektisit etkisinin olduğunun bilinmesine karşın pratikte doğel kaynakların az olması ve ruhsat alınmadaki zorluktan dolayı az yararlanılmaktadır (Isman 1997).

1.5.1 *Musca domestica* (Ev sineği)

İnsan topluluklarının yerleştiği her alanda uyum sağlayan Muscidae familyasının bir üyesidir. Genel olarak renkleri koyu gri ve siyah olan uzunlukları 5-8 mm arasında değişen iki kanatlı sinek türüdür. İyi uçma yetenekleri ve çok yüksek üreme sahip olmaları ile geniş bir alana yayılım gösterirler. Yaşam döncülerinde 4 evre bulunur. Bunlar yumurta, larva, pupa ve erişkin evreleri. Organik çürüyen materyal üzerine bırakılan yumurtalardan saatler içinde larva çıkışı olur (Çağlar 1987).

1.5.2 *Culex pipiens* (Sivrisinek)

Ülkemizin iklimsel ve ekolojik özelliklerli *Culex pipiens* türlerinin yaşaması için uygun şartlara sahiptir. Türkiye’de yedi cinse ait toplam 50 sinek türünün olduğu yapılan araştırmalarla saptanmıştır. *Cx.pipiens* yumurtalarını foseptik çukurları, bodrum katlarındaki su birikintileri, kirli su birikintileri içerisinde, su yüzeyine genel olarak bir defada paketler (kümeler) şeklinde bırakmaktadır. Hayat döngüleri 4 evrede gerçekleşmektedir:yumurta,pupa,larva ve erişkin (Hüseyin ve Atila 2004).

1.6 HPLC

Kromatografi ilk olarak 1906’da Rus botanikçisi Mikhail Tswett tarafından kullanılmıştır. İlk modern cihaz 1965 yılında Csaba Horvath tarafından geliştirildi. Kromatografi terimi Yunanca kökenli olup “renk yazımı” anlamındadır (Burcu 2017).

Kromatografi çok geniş bir yelpazede ölçüm,ayırıştırma ve saflaştırma gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Farklı alanlarda kullanılan kromatografinin en yaygın kullanım alanına sahip olanı ise sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS/MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazlarıdır.

Kromatografi karışım içindeki maddeleri birbirinden ayırmak ve miktarının ölçülmesidir. Bu sabit bir faz üzerinde hareketli bir faz yardımıyla değişik hızlarla hareket etmeleri esasına dayanır. Cihaz kullanımında mobil faz, sabit faz ve alıkonma gibi terimler etkin rol oynamaktadır.

1.7 Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz çok sayıda canlı grubunda bulunan bir enzimdir. İlk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından zehirsiz mantarlarda olduğu bildirilmiştir. Sonraki dönemlerde meyve ve sebzelerde de karakterize edilmiştir. Bitkilerin enfeksiyonlara karşı korunmasında da önemli role sahiptir (Bahar ve Betül 2018). Enzim saç ve deri renginde rol oynayan, bakır kofaktörlüdürler. Melanin salgılanmasında da anahtar rol oynar. Ayrıca meyve ve sebzelerde fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizlemektedir (Ramazan 2015) .

2. YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan *Anemone* Türleri, Özellikleri ve Toplanması

Çalışmaya başlanılmadan önce kullanılan *Anemone* türü ile ilgili bilgiler, kaynaklar taranarak tespit edilmiş, türün gereken özellikleri çıkartılıp arazi planı oluşturulmuştur.

Bitkiler toplanırken arazideki diğer bitkilerin ve endemik türlerin tahrip edilmemesine özen gösterilmiştir. *Anemone coronaria* Denizli ilinde Nisan ayı 2018 yılında toplanmıştır. Türün yaşam koşulları ile ilgili bilgiler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.1: *Anemone coronaria*

Ömür	Çok yıllık
Yapı	Ot
Hayat formu	Geofit
Çiçeklenme	Nisan ve mayıs
Habitat	Çalılıklar,yol kenarları, meralar kayalıklar
Yükseklik	900 m
Endemik	Endemik değil
Genel dağılış	Türkiye



Şekil 2.1: *Anemone coronaria*

2.1.2 Bitkisel Ekstraktların Hazırlanması

Arazide toplanan bitki örneklerinin yer altı (yumru) ve yer üstü (çiçek ve yaprak) kısımlarının her birinin üstlerindeki toprak temizlendikten sonra ayrı ayrı gazete veya filtre kağıdı üzerinde güneş ışığı görmeyen ve düşük nemli ortamda kurutulmuştur.



Şekil 2.2: *Anemone coronaria* blender yardımıyla toz haline getirilmiş hali

Kuruyan kısımlar blender yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz halindeki yer altı ve yer üstü kısımları 250 ml'lik erlen mayerlere belli oranlarda konulup

üzerlerine çeşitli çözücüler (etanol, aseton ve su) eklenip çalkalamalı su banyosuna (Memmert WNB 22) konulmuştur.



Şekil 2.3: Çalkalamalı su banyosu

Çalkamalı su banyosunda 49 °C’de 6 saat tutulmuştur. 6 saat sonrasında Whatmann No:4 kağıdında süzülen bitkiler; üzerlerine yine aynı çözücüden dökülerek bu işlemler 3 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen süzüntüler; etanol 60°C,aseton 50°C’de rotary evaporatörde (Ika RV 10) tutularak çözücülerinden uzaklaştırılmıştır.



Şekil 2.4: Rotary evaporatör

Evaporatörden kalan kısım ise -80 °C’de bir süredondurulmuştur. Donma işleminden sonra kalan su kısmı; liyafilizatör (Freeze Dryer)(Labconco Freezone 6) aletinde -54 °C’deuçurulmuştur.Bu işlemden sonra elde edilen ekstraktlar -20 °C’de saklanmıştır



Şekil 2.5: Liyafilizatör

2.2 Yöntemler

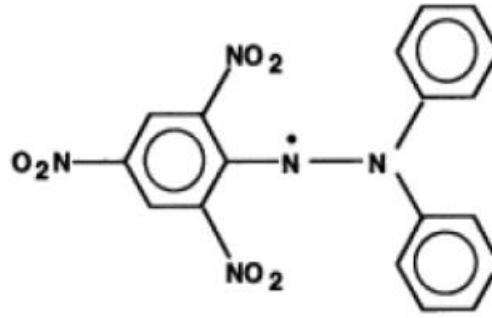
2.2.1 Antioksidan Aktivite Yöntemleri

2.2.1.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi

İlk kez 1958 yılında Bois tarafından DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) radikallerinin antioksidan moleküllerin tayininde kullanıla bileceğinin önerilmesi ile ortaya çıkmıştır. Brand-Williams ve arkadaşları (1995) tarafında bu yöntem geliştirilmiş ve pek çok araştırmacı tarafından referans olarak kullanılmıştır. Bu yöntem bitkideki antioksidanların DPPH serbest radikallerinin süpürücü etkilerini ölçmeye dayanan bir yöntemdir (Brand-Williams ve diğ1995).

Yöntemin esası mor renkli DPPH çözeltilisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelmesi ve antioksidanların varlığıyla radikalin rengi sarıya doğru açılması üzerinedir. DPPH radikali 517 nm’de maksimum absorbsiyon verir. Bu yöntem antioksidanların etkilerini gösteren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir (Blois 1958).

Yöntemin serbest radikal süpürücü etkisi ekstraktların serbest DPPH radikalikullanılarak belirlenmiştir (Wu 2006). 4 mL %0.004'lük (w/v) metanolik DPPH çözeltisi ile 1 mL (0,2–1 mg) ekstrakt çözeltileri karıştırılmıştır. Karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyondan sonra örnekler spektrometre de 517 nm absorbansda ölçülmüştür. Tüm deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Pozitif kontrol olarak BHA kullanılmıştır.



Şekil 2.6: DPPH radikalinin kimyasal yapısı

Pozitif kontrol olarak BHA kullanılmıştır.

Özütlerin absorbans değerleri kullanılarak % inhibisyon değerleri:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

formülüyle hesaplanmıştır.

Formüldeki A_0 kontrolün absorbansı ve A_1 örneğin absorbansıdır (Duh 1997).

Elde edilen % inhibisyon değerleri, mg/mL olarak belirlenen özüt derişimlerinekarşı grafiğe geçirilmiştir.

2.2.1.2 β -KAROTEN-LINOLEİK ASİT YÖNTEMİ

Bu metot linoleik asidin ısı ve hava oksidasyonu ile serbest radikal zincir reaksiyonu sonucu oluşan alkil peroksit tarafından β -karotenin renk açılımının izlenmesi temeline dayanır (Wang 2006).

İlk önce metotta emülsiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 2 mg β -karotenin 10 mL kloroformda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 1 mL alınıp içine, 40 mg linoleik asit ve 400 mg Tween 20 ilave edilmiştir. Kloroform rotary evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra 100 mL saf su ile karıştırılmıştır. Bu

emülsiyon, 4.8 mL 0,2 mg örnek içeren 0.2 mL ekstrakt çözeltileri bulunan test tüplerine ilave edilmiştir. Emülsiyon test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre (Optizen POP UV/Vi) kullanılarak başlangıç absorbansları 470 nm' de ölçülmüştür. Tüpler 50 °C'de inkübasyona bırakılmış ve β-karotenin rengi kayboluncaya kadar inkübasyona devam edilmiştir (120 dakika). Butest sisteminde BHA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır Toplam antioksidan aktivite aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$AA: [1 - (A_0 - A_t / A_{00} - A_{t0})] \times 100$$

Burada A₀ örneğin ilk absorbansı, A_t kontrolün ilk absorbansı, A₀₀ örneğin 120 dk sonraki absorbansı, A_{t0} kontrolün 120 dk sonraki absorbansıdır . (Amin ve diğ 2004).

2.2.1.3 İndirgeme Gücü Kapasitesi (FRAP) Yöntemi

Metot antioksidanlar tarafından ortamdaki (Fe(III)-TPTZ) kompleksinin (Fe(II)- TPTZ) indirgenerek 593 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır. 1 mL bitki ekstraktı, 1mL fosfat tampon çözeltisi (0.2 M pH=6.6) ve 2.5 mL %1 lik potasyum ferrisiyanat (K₃Fe(CN)₆) çözeltisi bir deney tüpüne ilave edilmiştir. Kuvvetlice çalkalıp, 50 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda üzerine 2.5 mL trikloro asetik asit çözeltisi(%10 luk suda) ilave edildikten sonra santrifüjlenmiştir. Çözeltinin üzerinden 2.5 mL alınarak 0.5 mL %0.1 lik FeCl₃ ilave edildikten sonra 700 nm de absorbansı okunmuştur. Tüm işlemler Troloks için de uygulanmıştır. Konsantrasyon arttıkça artan absorbans değeri indirgeme yeteneğini göstermiştir (Oyaizu 1986).

2.2.1.4 CUPRAC Yöntemi

Bitki özütlerinin 0.2 ile 1 mg/mL arasındaki farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Yöntemde her bir deney tüpüne 1 ml CuCl₂.2H₂O, 1 ml amonyum asetat, 1 ml neokuproin çözeltileri ile 0.6 ml saf su eklenmiştir. Daha sonra her bir tüpe bitkisel çözeltilerden 0.5 ml eklenip iyice karıştırılmıştır. Tüpler ağızları kapalı bir bikimde oda

sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda absorbansları 450 nm’de okunmuştur (Apak ve diğ 2006).

2.2.1.5 ABTS Radikal Giderim Aktivitesi

Distile suda hazırlanmış 7.4 mM ABTS (2,2’-Azino-bis,3- etilbenzenothiazoline-6-sülfonik asid) çözeltisi ve potasyum persülfat çözeltisinden 1 ml alınarak karıştırılmış ve 12-16 saat karanlıkta bekletilmiştir. Kullanmadan önce solusyon spektrometrede 734 nm’de ölçülür ve 700 nm kadar etanol ile seyretildiHer deney için bu karışım taze olarak hazırlanmıştır. Ekstraktlardan stok hazırlanıp ve stoktan 5 konsantrasyon elde edilmiştir (0.05-0.25 mg/ml). Hazırlanan metanollü ABTS çözeltisinden 2 ml alınıp oluşturulan konsantrasyonlar üzerine eklenmiştir. Bitki ekstresi konulup 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Spektrofotometrede 734 nm’de absorbans değeri okunmuştur. Standart olarak BHA kullanılmıştır. BHA yardımı ile çizilen standart eğriden ABTS radikal giderme aktivitesi hesaplanmıştır (Re ve diğ. 1999). Kullanmadan önce solusyon spektrometrede 734 nm’de ölçülür ve 700 nm kadar etanol ile seyretildi.

$$\text{ABTS radikal giderme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

$$A_0 = \text{Kontrol absorbans değeri}$$

$$A_1 = \text{Örnek veya standardın absorbans değeri}$$

Deney sonuçları farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BHA ile elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak değerlendirilmiştir (Re ve diğ. 1999).

2.2.1.6 Şelatlama Kapasitesinin Belirlenmesi

Örneklerin Fe²⁺ iyonlarını şelatlama kapasiteleri (Dinis ve diğ. 1994) tarafından belirtilen yönteme göre tespit edildi. İçerisinde 2.0 ml özüt çözeltisi (1.0 mg.mL⁻¹) bulunan test tüplerine 2 mM 0.05 mL FeCl² çözeltisi ilave edilmiştir. Tepkime 0.2mL 5 mM ferrozin ilavesiyle başlamıştır. Çözelti karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılıp sonrasında 562 nm’de absorbans

ölçümü yapılmıştır. Ferrozin - Fe²⁺ oluşum inhibisyonu (%) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Metal şelatlama kapasitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Burada;

A_{kontrol}: Kontrolün absorbansı

A_{örnek} : Örneğin absorbansı

2.2.1.7 Fosfomolibdenyum Yöntemi

Bu yöntem, özüt varlığında Mo(VI)'nın Mo(V)'e indirgenmesi sonucunda asidik pH'larda oluşan yeşil renkli fosfat-Mo(V) kompleksinin spektrofotometrik olarak takip edilmesi temeline dayanmaktadır (Prieto ve diğ. 1998). İçerisinde 0.01 mL özüt bulunan test tüplerine 3.0 mL reaktif çözeltisi (0.588 M sülfürik asit, 0.036 mM sodyum fosfat ve 0.049 mM amonyum molibdat) ilave edilmiştir. Test tüpleri 95 °C'de 90 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve köre karşı (3.0 ml reaktif çözelti ve 0.1 ml çözücü) 695 nm'de absorbans değerleri tespit edilmiştir. Özütlerin toplam antioksidan kapasiteleri standart askorbik asit grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir:

$$\text{Absorbans} = 0,0169 (\text{ askorbik asit}) - 0,0071 (R^2:0.9999).$$

2.2.2 Miktar Tayin Yöntemleri

2.2.2.1 Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Bitkiye ve meyveye kendine has renk ve tat, koku gibi özellikler veren asıl amacı bitkiyi korumak olan maddelerdir. Fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edilmiştir. Gallik asite eşdeğer olarak belirlenmiştir. 1 mg örnek içeren çözeltiler de iyonize su ile 46 mL'ye tamamlanmıştır. Bu karışıma 1mL FCR ve 3 dk sonra 3 mL % 2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden ilave edilmiştir. Karışım 2 saat oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildikten sonra örnekler spektrofotometrede 760 nm'de ölçülmüştür (Singleton ve Rossi 1965). Ekstrelerin toplam fenolik miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir:

$$\text{Absorbans} = 0.001 \text{ gallik asit } (\mu\text{g}) - 0.004 \text{ (R}^2\text{: 0.9967)}$$

2.2.2.2 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini

Bitkilerde flavonoid tayini (Arvouet-Grand ve diğ 1994) tarafından belirlenen yöntem kullanılarak quercetin'e eşdeğer olarak belirlenmiştir. İçerisinde 1.0 mL özüt çözeltisi (1.0 mg/mL) bulunan test tüplerine % 2.0'lik 1.0 mL metanolde hazırlanmış AlCl₃ çözeltisi ilave edilip oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kör örnek 1.0 mL özüt çözeltisi (1.0 mg/mL) ve 1.0 mL metanol içermektedir

Absorbans ölçümleri 415 nm'de gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların toplam flavonoid bileşik miktarları standart quercetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir:

$$\text{Absorbans} = 0.0255 \text{ quercetin } (\mu\text{g}) - 0.0198 \text{ (R}^2\text{: 0,997)}$$

2.2.2.3 Toplam Tanen Miktarının Belirlenmesi

Toplam tanen miktarının belirlenmesi Glasl(1983) metoduna göre çalışılacaktır. Tanenler, birçok gıdada doğal olarak bulunan, polifenollerdir. Acı lezzetli bir maddedir, tannik asitte denir. Saf halde sarı bir tozdur. İçerisinde 1.0 mL özüt bulunan test tüpleri üzerine % 1.0'lik 0.5 mL tannik asit solusyonu ilave edilmiştir. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir 500 nm de ölçümü yapılmıştır. Tanen içeriği, kateşin eşdeğeri (mgCE / g) olarak ifade edilmiştir.

2.2.2.4 YPSK (HPLC) Yöntemi ile Bitkideki Fenolik Bileşen İçeriklerinin Belirlenmesi

Bitkilerdeki standart fenolik bileşiklerin tayini Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİLTEKMER)'nde bulunan Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yardımıyla analiz edilmiştir. Kullanılan Sistem: Shimadzu Prominence Marka HPLC.

CBM: 20ACBM

Dedektör: DAD (SPD-M20A)

Kolon Fırını: CTO-10ASVp

Pompa: LC20 AT

Autosampler: SIL 20ACHT

Bilgisayar Programı: LC Solution

Mobil Faz;

A: %3 Formik asit

B: Metanol

HPLC analizinde Gomes ve diğ. (1999)'nin metodu modifiye edilerek kullanılmıştır, 0.2 g numune tartılmış, mobil fazda çözülmüş, 0.45 µm filtreden geçirilip HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

2.2.3 Enzim Deneyleri

Enzimler ilk olarak 1835 yılında İsveçli kimyacı Jöns Jacob Berzelius tarafından tanımlanmıştır. Kataliz terimini kullanan ilk araştırmacıdır. Protein yapısında olan enzimler organizmadaki biyolojik olayları katalizleyen biyokatalizörlerdir. Enzimlerin en önemli özellikleri spesifik olmalıdır. Yalnızca canlı hücreler tarafından sentezlenir. Hücre içinde fonksiyon gösteren enzimler “intraselüler”(hücre içi) enzimler, hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınıp orada fonksiyon gösteren enzimlere “ekstraselüler” (hücre dışı) enzimler denir (Duygu 2007).

2.2.3.1 Tirosinaz Enzimi İnhibitör Aktivite Yöntemi

Tirosinaz İnhibitör aktivitesi 96- wellmikroplate içine 25µl örnek solüsyonu ve üzerine tirosinaz enzim solüsyonu (50 µl) eklenir 10 dakika boyunca 25 ° C'de

inkübe edilmiştir. Her bir tüp içine hazırlanmış olan (23 µl tirozinaz tahlil tamponu, 2 µl tirozinaz substratı, 5 µl tirozinaz güçlendirici) tirozinaz substrat solusyonu eklenip ve iyice karıştırılmıştır. Örnekler kinetik modda absorbansı 30-60 dakika boyunca 510 nM'de ölçülür. Değerler kojik asit eşdeğerine göre ifade edilmiştir .

2.2.4 Brine Shrimp Kullanarak Potansiyel Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Bu aktivitenin belirlenmesinde Brine Shrimp Toksikite Analiz yöntemi kullanılmıştır (Meyer ve diğ 1982). Ekstraktlarından (10 mg/ml) yapay deniz suyu ile hazırlanan 50, 100, 250, 500 ve 1000 ppm'lik çözeltiler kullanılmıştır. Test tüpleri son hacim 5 mL olacak şekilde deniz suyu ile doldurulmuştur. Kullanılacak olan deniz suyu için 0,35 gr tuz ve 1 L çeşme suyu kullanılmıştır. Belirtilen yöntemde *Artemia salina* yumurtaları kullanılmıştır. Bu yumurtalar, içerisinde 2 L yapay deniz suyu bulunan 5 L hacimdeki plastik, şeffaf, ağzı açık bir tank içerisine 2 g tartılarak serpilmiştir. Tank içerisindeki yapay deniz suyu çift çıkışlı bir hava motoru ile çift hortum kullanılarak sürekli havalandırılmıştır. Ayrıca tank üzerindeki su sıcaklığı 28 0C'de sabit tutulacak şekilde termostat ile ısıtılmıştır. Tank masaüstü ışık kaynağının yanında 48 saat aydınlıkta bırakılmıştır *A. Salina* larvalarının yumurtadan çıkmaları beklenmiştir. *A. salina* larvaları yumurtadan çıktıktan sonra yoğun olan bölgeden bir mikropipet yardımıyla yaklaşık 10 µl su ile alınan larvalar stereomikroskop altında petri kabına aktararak 30'ar adet sayılmıştır. İçerisinde 10, 50, 100, 500, 1000 ppm'lik bitki ekstraktı bulunan camtüpler içerisine 30 adet canlı organizma aktarılmıştır. 24 saat ışık altında geçen süre sonunda bir büyüteç yardımıyla canlı ve ölü larvaların adeti sayılmış ve LC₅₀ değeri ile % 95 güvenirlilik alt ve üst limitleri EPA (The U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A.) Probit Analiz programı (Version 1.5) kullanılarak hesaplanılmıştır. Toksikite derecelerinin değerlendirilmesinde referans değerler kullanılmıştır (Brayn ve diğ 1997).

2.2.5 Bitki Ekstraktlarının İnsektisit Etkisi

2.2.5.1 *Musca domestica* (Ev sineği) Üzerindeki Larvasidal Etkisi

Bitkilere ait ekstraktların insektisit aktiviteleri Kristensen ve Jespersen (2003) yöntemini modifiye edilerek araştırılmıştır. Bu çalışmada *Musca domestica* (ev sineği) kullanılacaktır. *Musca domestica* kültürü için süt ve şeker kullanılıp karışım 1:3 ve 50 g olarak hazırlanmıştır. 25'er adet ev sinekleri yumurtalarından

alınarak ekstrakt ve nem içeren besiyeri kaplarına aktarılmıştır. 24-36 saat sonra yumurtalar açılmaya başlaması ve larvalar çıkması beklenmiştir. 3 haftalık süre içinde larvasit etki kayıt altına alınmıştır. Larvasit etki 12:12 fotoperiyodunda, 26C' de laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir. Ekstrakt denemesi için 4 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Tüm deneyler 3 kez gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.2 *Culex pipiens* (Sivrisinek) Üzerindeki Larvasidal Etkisi.

Bitkilere ait ekstraktlarınintektisidal etkileri WHO (1963) standart metotlarına göre yapılmıştır. Bu çalışmada sivrisinek (*Culex pipiens*) kullanılmıştır. Çalışma 4 dozda (100 , 250 , 500 , 1000 ppm) yapılmıştır. Her doz için 100 mL distile suya ekstrakt konulup, kaplara ardından içine 12 adet 2. ve 3. evre larva eklenmiştir. Kaplara birer tane balık yemi konulmuştur. Kaplar 26 ± 2 °C ve % 60 ± 10 nem oranında tutuldu. Ölümler 24-, 48 saat olmak üzere kayıt altına alınmıştır. Her deney 3 defa tekrar edilmiştir. Bu ölümlere bakılmıştır.

2.2.6 İstatistik Hesaplamalar

İstatistik hesaplamaları Microsoft Excell proqramı ile yapılmıştır. Brine shrimp sitotoksik etkisi, ev sineğine karşı larvasidaletki deneylerinin sonuçlarından STATPLUS Pro 5.9.8 programında $LC_{50(\min)}$, $LC_{50(\max)}$, LC_{50} , LC_{90} ve ki-kare (x^2) değerleri hesaplanmıştır

3.BULGULAR

3.1 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi , İndirme Gücü ve Miktar Tayin Yöntemleri

3.1.1 Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin Belirlenmesine Yönelik Deney Sonuçları

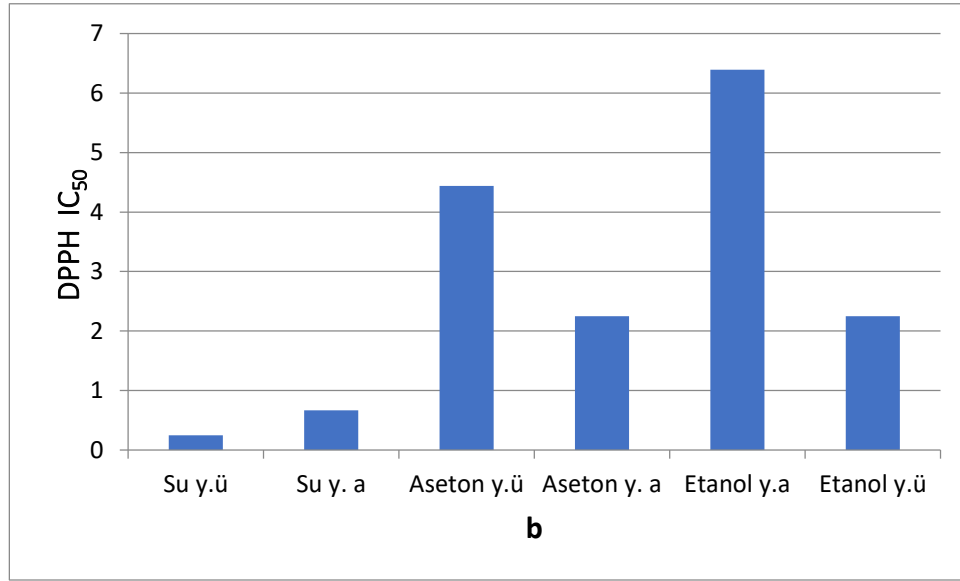
1) DPPH Yöntemi

Anemone coronaria bitki ekstraktlarının DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri, beş farklı konsantrasyonda belirlenmiştir.. *Anemone coronaria* türünün yer altı ve yer üstü ekstraktlarının konsantrasyona bağlı serbest radikal giderim

aktivitesinin IC₅₀ değerleri aşağıdaki Tablo 3.1'te ve grafikleri Şekil 3.1'te verilmiştir. Pozitif kontrol olarak BHA sentetik antioksidan kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Ekstraktların yer altı (y.a) ve yer üşü (y.ü) kısımlarının IC₅₀ değerleri

		<i>Anemone coronaria</i>					
Su y.ü	Su y. a	Aseton y.ü	Aseton y. a	Etanol y.a	Etanol y.ü	BHA	
0.25±0.06	0.67±0.08	4.44±0.20	2.25±0.11	6.39±0.12	2.25±0.08	98.13±0.96	



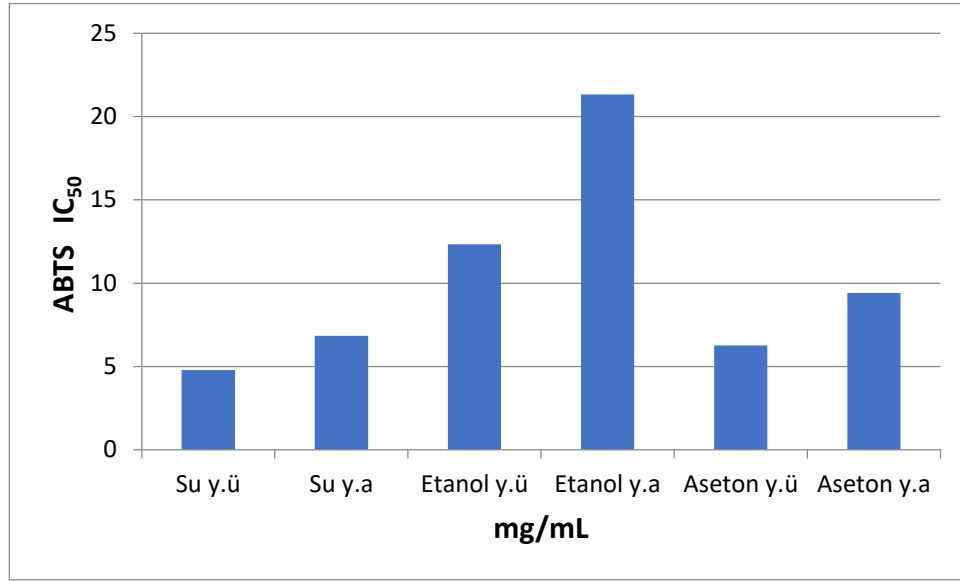
Şekil 3.1: *Anemone coronaria* ekstraktlarının yer üşü (y.ü) ve yer altı (y.a) kısımlarının IC₅₀ grafiği

2) ABTS Radikal Giderim Aktivitesi

Bitki ekstraktların ABTS giderim aktiviteleri aşağıdaki Tablo 3.2'te gösterilmiştir. Sonuçlar ekstraktların konsantrasyona bağlı yüzde değerleri hesaplanarak elde edilen değerlerin ortalamalarından eğri çıkarılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak BHA kullanılmıştır. *Anemone coronaria* türünün su yer üşü kısmında IC₅₀ değeri düşük, en yüksek değeri etanol yer altı kısmında çıkmıştır.

Tablo 3.2: Bitki ekstraktlarının yer altı (y.a) ve yer üşü (y.ü) kısımlarının IC₅₀ değerleri

		<i>Anemone coronaria</i>					
Su y.ü	Su y.a	Etanol y.ü	Etanol y.a	Aseton y.ü	Aseton y.a	BHA	
4.79±0.01	6.84±0.24	12.34±0.75	21.33±0.56	6.27±0.03	9.42±0.07	96.31±0.16	

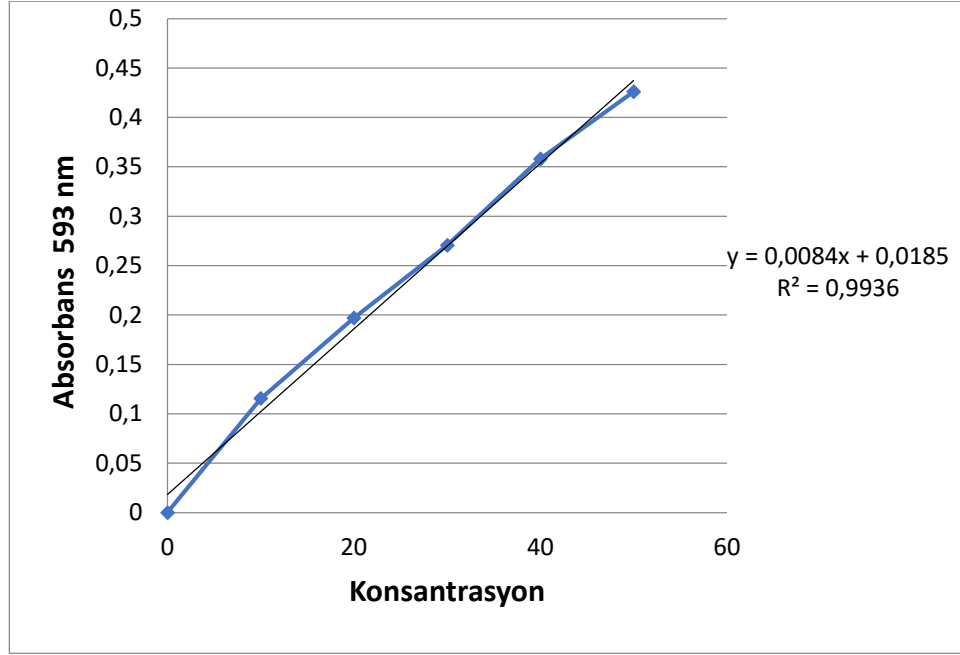


Şekil 3.2: Su, etanol ve aseton ekstraktlarının yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının IC₅₀ grafiği

3.1.2 İndirgeme Gücü Kapasitesine Yönelik Deneysel Sonuçları

1) FRAP Yöntemi

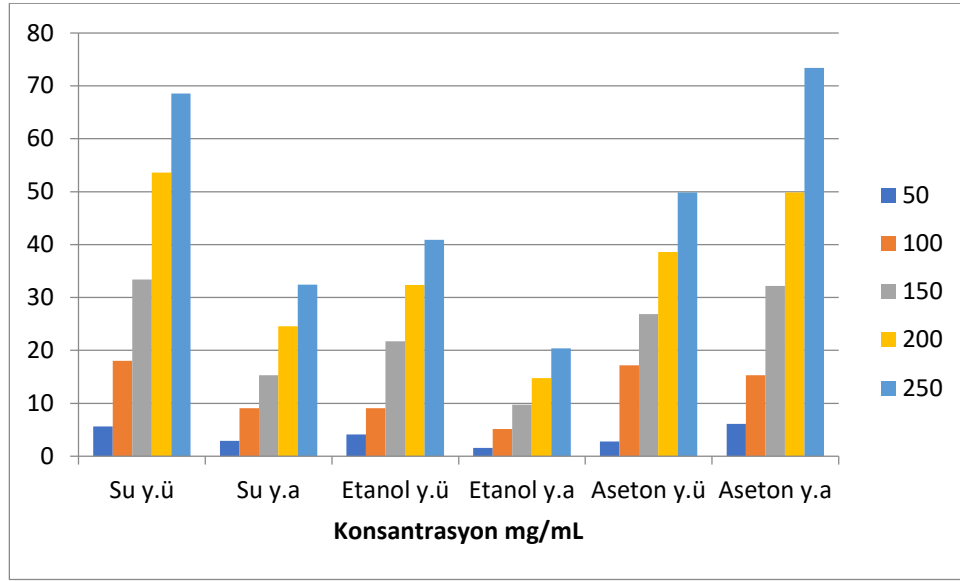
Anemone coronaria türünün yer altı ve yer üstü kısımlarının aseton, su, etanol ile hazırlanan ekstraktları farklı konsantrasyonları 593 nm’de ölçülerek sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar standart troloks kullanarak hesaplama yapılmıştır. Yöntem Fe(III)/TPTZ kompleksinin indirgeme prensibine dayanmaktadır. En yüksek değer *anemone* türünün aseton yer altı ekstraktında 73.41 ± 0.00 mg/mL absorbans değeri göstermiştir, en düşük değeri etanol yer altı ekstraktında 1.54 ± 0.00 mg/mL absorbans değeri göstermiştir.



Şekil 3.3: Troloksa ait kalibrasyon eğrisi

Tablo 3.3: *Anemone coronaria* türünün aseton, su, etanol ekstraktlarının yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının Frap deney sonuçları

	Anemone coronaria				
	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	200 mg/mL	250 mg/mL
Su y.ü	5.62±0.00	18±0.00	33.41±0.00	53.62±0.02	68.58±0.01
Su y.a	2.87±0.00	9.08±0.00	15.29±0.00	24.54±0.01	32.45±0.01
Etanol y.ü	4.12±0.01	9.04±0.00	21.70±0.00	32.37±0.01	40.91±0.01
Etanol y.a	1.54±0.00	5.12±0.00	9.75±0.00	14.75±0.00	20.41±0.00
Aseton y.ü	2.79±0.00	17.20±0.01	26.87±0.00	38.62±0.01	49.87±0.01
Aseton y.a	6.08±0.01	15.33±0.00	32.16±0.01	49.87±0.01	73.41±0.00



Şekil 3.4: Ekstraktların yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının Frap deneyinde farklı konsantrasyonlardaki absorbans grafiği

2) Şelatlama Kapasitesi Yöntemi

Çalışılan bitkinin metal şelatlama kabiliyeti demir-ferrozün kompleksi ölçülerek belirlenmiştir. Şelatlama kabiliyeti Fe^{+2} çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar EDTA ile karşılaştırılmıştır. Etanol yer üstü ekstraktını diğer ekstraktlarla karşılaştırıldığında daha yüksek şelatlama kabiliyeti göstermiştir. Sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Ekstraktların yer altı ve yer üstü kısımlarının metal şelatlama kabiliyeti mg/mL

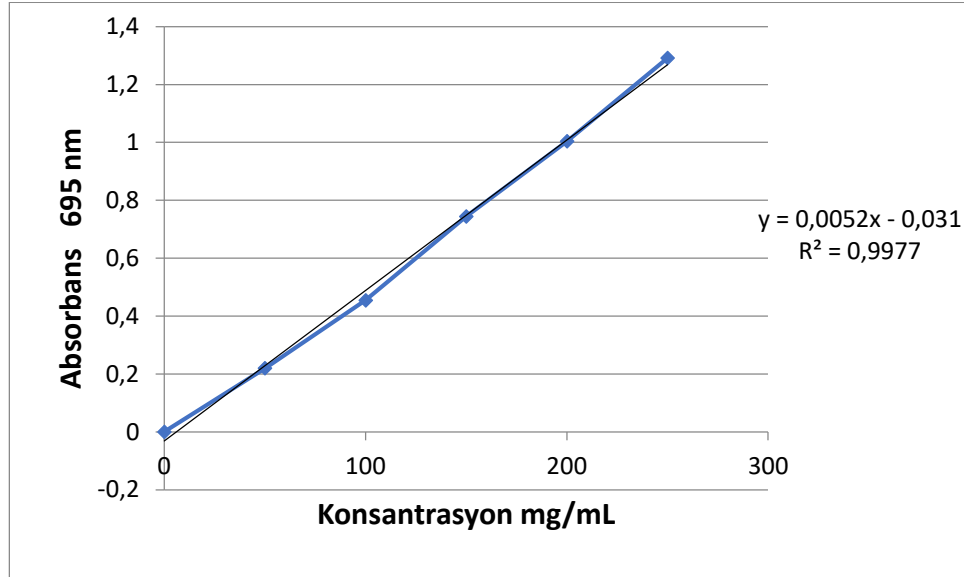
Aseton y.a	Aseton y.ü	Etanol y.a	Etanol y.ü	Su y.a	Su y.ü
0.20±0.04	0.24±0.00	0.17±0.00	0.25±0.02	0.23±0.025	0.13±0.01

3) Fosfomolibdenyum Yöntemi

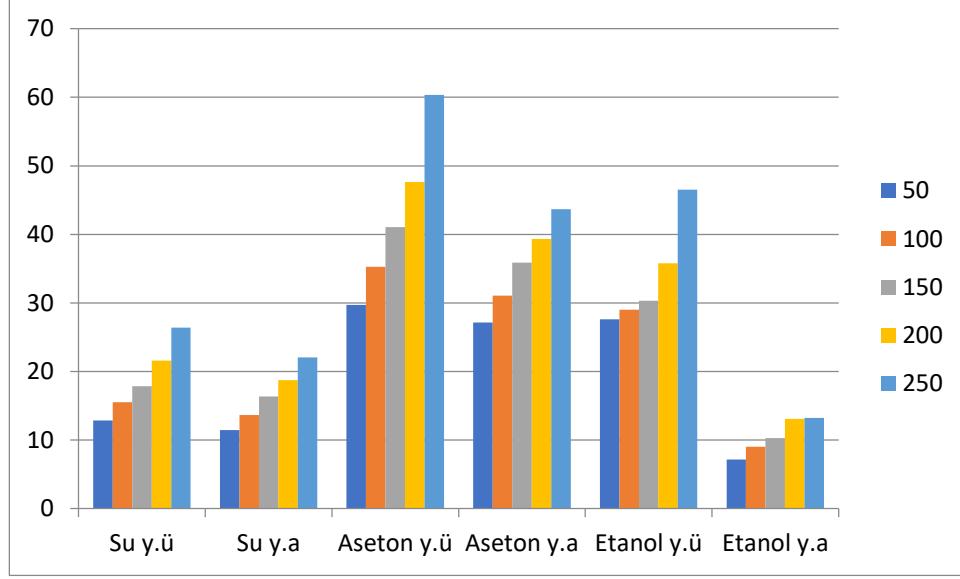
Fosfomolibdenyum deneyinde standart askorbikasite eşdeğer olarak hesaplamalar yapılmıştır. Deney antioksidan bileşikler tarafından Mo(VI), Mo(V) e indirgemesi sonucu oluşan yeşil renkli kompleksin spektrometrede 695 nm'de ölçülmesi temeline dayanır. Prosedür için hazırlanmış aseton, su, etanol ekstraktlarından en yüksek değer 60.33±0.00 mg/mL aseton yer üstü kısmı göstermiştir. En düşük değer etanol yer altı kısmında 7.13±0.00 mg/mL göstermiştir.

Tablo 3.5:Bitki ekstraktlarının yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının fosfomolibdenyum deney sonuçları

	<i>Anemone coronaria</i>				
	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	200 mg/mL	250 mg/mL
Su y.ü	12.86±0.00	15.53±0.00	17.86±0.00	21.6±0.00	26.4±0.00
Su y.a	11.46±0.01	13.66±0.01	16.33±0.00	18.73±0.00	22.06±0.00
Aseton y.ü	29.73±0.00	35.26±0.00	41.06±0.01	47.66±0.02	60.33±0.00
Aseton y.a	27.13±0.01	31.06±0.02	35.86±0.01	39.33±0.02	43.66±0.01
Etanol y.ü	27.6±0.00	29±0.00	30.33±0.01	35.8±0.02	46.53±0.03
Etanol y.a	7.13±0.00	9±0.00	10.26±0.00	13.06±0.00	13.2±0.00



Şekil 3.5: Askorbik asite ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.5: Fosfomolibdenyum deneyi farklı konsantrasyonlardaki absorbans grafiği

4) β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi

Anemone coronaria türünün yer altı ve yer üstü kısımlarının aseton, etanol, su ekstraktlarının antioksidan aktivite değerleri β -Karoten-Linoleik asit yöntemi ile belirlenmiştir. En yüksek antioksidan değeri aseton yer altı kısmında (%79.16 mg/mL), en düşük değeri etanol yer altı kısmında (% 20.58 mg/mL) görülmüştür.

Tablo 3.6: *Anemone coronaria* yer altı ve yer üstü kısımlarının β -karoten-linoleik asit yöntemi

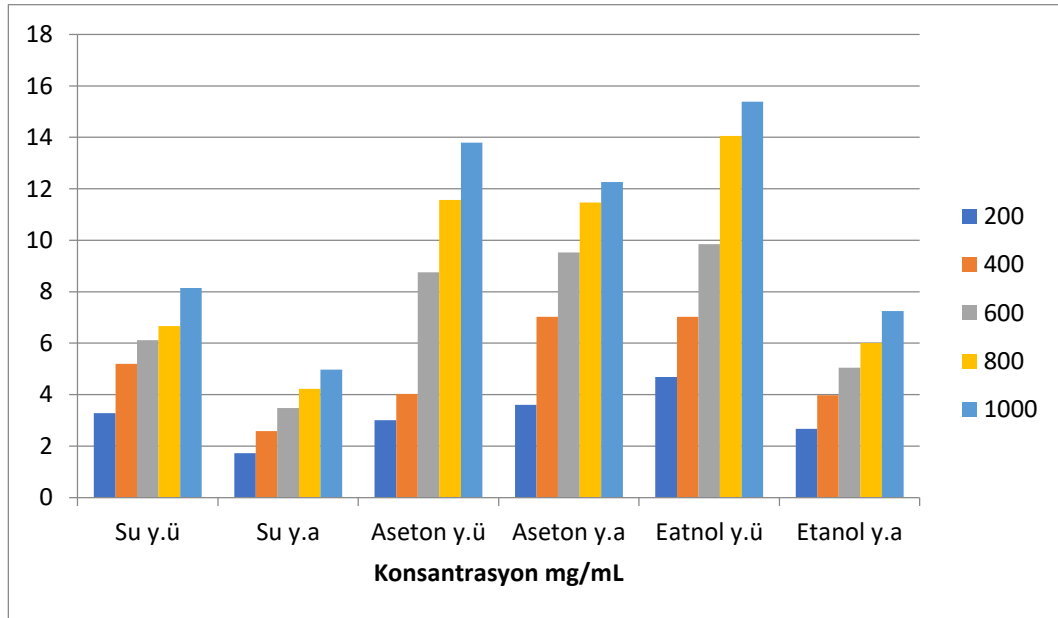
		<i>Anemone coronaria</i>			
Su y.a	Su y.ü	Etanol y.a	Etanol y.ü	Aseton y.a	Aseton y.ü
75.66	60	20.58	41.68	79.16	23.36

5) CUPRAC Yöntemi

Yöntem antioksidan bileşiklerin Cu(II)-neokuproin kompleksini Cu(I)-neokuproin kompleksine indirgemesi ve 450 nm’de maksimum absorbanı göstermesi prensibine dayanmaktadır. Yöntemde standart olarak Trolox kullanılmıştır . *Anemone coronaria* ekstraktlarının bakır indirgeme güçleri farklı konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir. Sonuç olarak en yüksek bakır indirgeme gücü etanol ve aseton yer üstü ekstraktlarının her ikisinde, en düşük indirgeme gücü su ve etanol yer altı ekstraktlarında tespit edilmiştir.

Tablo 3.7: Cuprac yöntemi ekstraktların yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) kısımlarının deney sonuçları

	<i>Anemone coronaria</i>				
	200	400	600	800	1000
Su y.ü	3.28±0.01	5.19±0.03	6.12±0.01	6.66±0.01	8.14±0.04
Su y.a	1.73±0.00	2.58±0.02	3.48±0.02	4.23±0.02	4.97±0.04
Aseton y.ü	3±0.02	4.03±0.01	8.76±0.00	11.57±0.00	13.79±0.00
Aseton y.a	3.6±0.04	7.03±0.01	9.52±0.00	11.47±0.01	12.26±0.02
Etanol y.ü	4.69±0.03	7.02±0.04	9.85±0.06	14.06±0.05	15.39±0.02
Etanol y.a	2.67±0.00	3.98±0.02	5.05±0.01	6.01±0.01	7.25±0.03



Şekil 3.6: CUPRAC yöntemi farklı konsantrasyonlardaki absorbanı grafiği

3.1.3 Miktar Belirlenmesine Yönelik Deney sonuçları

1) Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi Sonuçları

Anemone coronaria yer altı,yer üstü kısımlarının aseton,su ve etanol ekstraktlarının fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edilmiştir. Bitki örneklerin toplam fenolik madde miktarları gallik aside eşdeğer olarak (mgGAE/g) hesaplanmıştır. En yüksek değer aseton yer üstü kısmında 68.33 (mgGAE/ g) bulunmuştur . Aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

$$y=0,001x-0,004$$

Tablo 3.8: Yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) ekstraktlarının fenolik madde miktarı

		<i>Anemone coronaria</i>			
Su y.a	Su y.ü	Aseton y.a	Aseton y.ü	Etanol y.a	Etanol y.ü
29.5±0.00	38.83±0.00	51.8±0.00	68.33±0.03	29.16±0.00	41.33±0.00

2) Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi Sonuçları

Anemone coronaria türünün flavonoid madde miktarı quersetin kalibrasyon grafiği ile elde edilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda ekstraktlardaki madde miktarı quercetin'e eşdeğer (mgQE/g) olarak belirlenmiştir. En yüksek flavonoid miktarı aseton yer üstü kısmında 118.42 (mgQE/g), en düşük etanol yer altı kısmında 11.64 (mgQE/g) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.9: Yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) ekstraktlarındaki flavonoid madde miktarları

		<i>Anemone coronaria</i>			
Aseto y.ü	Asetony.a	Su y.ü	Su y.a	Etanol y.ü	Etanol y.a
118.42±0.00	14.39±0.05	53.69±0.01	17.64±0.01	75.41±0.00	11.64±0.04

3) Toplam Tanen Madde Miktarının Belirlenmesi Sonuçları

Bitki ekstraktlarındaki tanen miktarı belirlenmiştir. Toplam tanen miktarı kateşin kalibrasyon grafiğinden çıkan denklem kullanılmıştır. Ekstraktlardaki toplam tanen miktarı kateşine (mgCE/g) eşdeğer olarak hesaplanmıştır. En yüksek tanen

miktarı aseton yer üstü kısmında 55.49 ± 0.13 (mgCE/g), en düşük tanen miktarı su yer altı kısmında 0.45 ± 0.00 (mgCE/g) tespit edilmiştir.

$$y = 0.0262 + 0.0341$$

Tablo 3.10: *Anemone coronaria* bitkisinin yer altı (y.a) ve yer üstü (y.ü) ekstraktlarının toplam tanen madde miktarı

Su y.ü	Su y.a	Etanol y.a	Etanol y.ü	Aseton y.ü	Aseton y.a
1.77 ± 0.00	0.045 ± 0.00	0.75 ± 0.00	13.01 ± 0.01	55.49 ± 0.05	39.1 ± 0.03

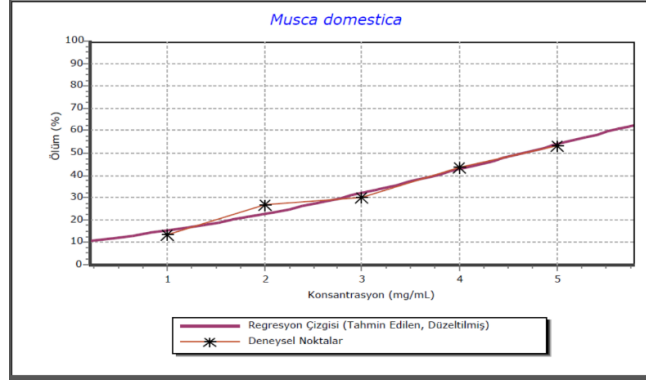
3.1.6 Bitki Ekstraktlarının Larvasidal Etkisi Deney Sonuçları

1) Bitki Ekstraktlarının Ev Sineği (*Musca domestica*) Üzerindeki Larvasidal Etkisi

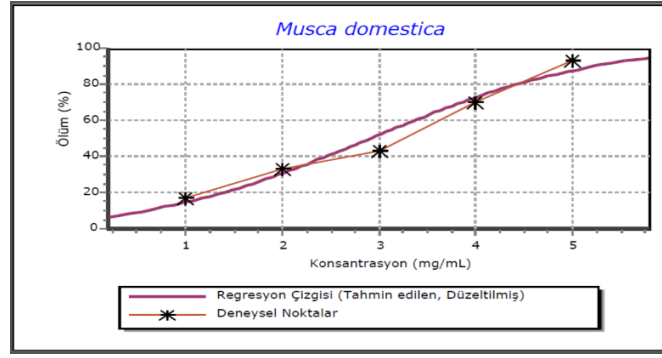
Bitki özütlerinin *Musca domestica* üzerinde insektisit deneyi doz olarak 1-5 mg/mL olarak denenmiştir. Ölüm oranlarının LC_{50} (min), LC_{50} (max), LC_{50} ve LC_{90} değerleri ve ki-kare (x^2) değerleri hesaplandı. Sonuç olarak aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.11: *Anemone coronaria* bitkisinin *M.domestica* larvalarına karşı ortalama ölüm oranlar (%) ve istatistiksel değerleri

	Yer altı Kısmı	Yer Üstü Kısmı
1 mg/mL	13.3 ± 0.58	16.6 ± 0.67
2 mg/mL	26.6 ± 0.33	33.3 ± 0.88
3 mg/mL	30 ± 0.33	43.3 ± 0.33
4 mg/mL	43.3 ± 0.58	70 ± 0.33
5 mg/mL	53.3 ± 0.33	93.3 ± 0.58
Kontrol (dH ₂ O)	10 ± 0.58	3.33 ± 0.33
LC₅₀ (min) (mg/mL)	3.62	2.13
LC₅₀ (mg/mL)	5.03	2.57
LC₅₀ (max) (mg/mL)	12.07	3.05
LC₉₀ (mg/mL)	30.14	6.80
x²	0.37	2.82



Şekil 3.7: *Anemone coronaria* bitkisinin su yer altı kısmının yüzde ölüm oranı grafiği



Şekil 3.8: *Anemone coronaria* bitkisinin su yer üstü kısmının yüzde ölüm oranı grafiği

2) Sivrisinek (*Culex pipiens*)

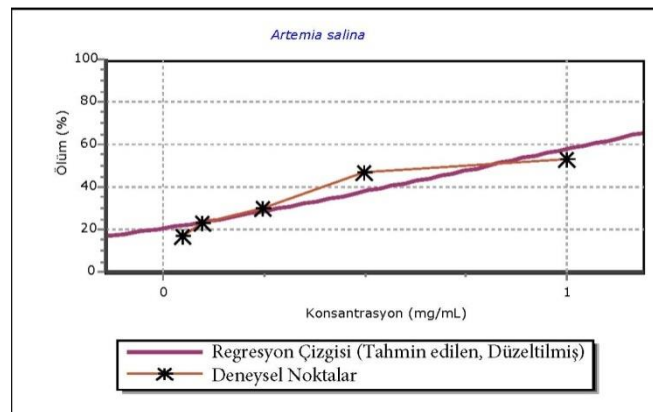
Culex pipiens üzerinde yapılan insektisit deneyinde doz olarak 0.1 - 1 mg/mL aralığında denenmesine rağmen herhangi bir ölüme rastlanılmadığından istatistiksel hesaplama yapılmamıştır..

3.1.7 Brine Shrimp (*Artemia salina*) Letalite Testi ile Bitki Ekstraktlarının Sitotoksik Etkisi Sonuçları

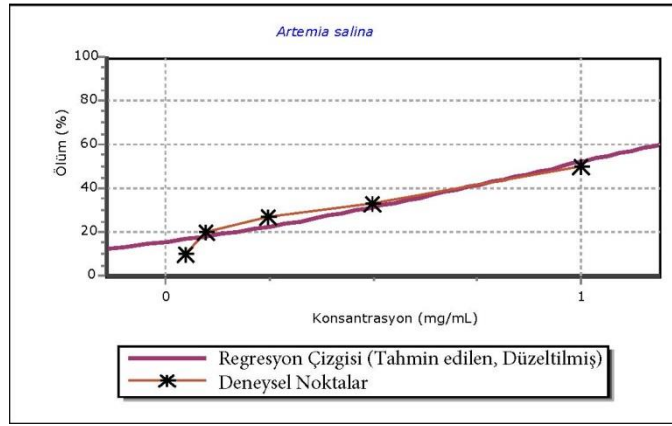
Bitki özütlerinin *Artemia salina* üzerinde yapılan insektisit etkisi deneyi, 5 farklı doz (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL)'de yapılmıştır. Her bir örnek için başlangıçta 10 adet larva kullanıldı. Deney başlangıcından itibaren 24 saat sonra ölen larvalar sayılarak ölüm oranları kaydedildi. Sonuç olarak ölüm oranlarının LC₅₀ (min), LC₅₀ (max), LC₅₀ ve LC₉₀ değerleri ve ki-kare (x²) değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 3.12: *Anemone coronaria* bitkisinin su yer altı, su yer üstü kısımlarının *A. salina*'ya Karşı ortalama ölüm oranları (%) ve istatistiksel değerleri

	Yer altı Kısmı	Yer Üstü Kısmı
0,05 mg/mL	16.7± 0,33	10 ± 0,58
0,1 mg/mL	23.3 ± 0,33	20 ± 0,58
0,25 mg/mL	30 ± 0,58	26.7± 0,33
0,5 mg/mL	46.7± 0,33	33.3 ± 0,33
1 mg/mL	53.3 ± 0,33	50 ± 0,58
Kontrol (dH ₂ O)	0	3.3 ± 0,33
LC₅₀ (min) (mg/mL)	0.41	0.58
LC₅₀ (mg/mL)	0.78	1.18
LC₅₀ (max) (mg/mL)	4.03	8.44
LC₉₀ (mg/mL)	26.75	32.54
x²	0.22	0.35



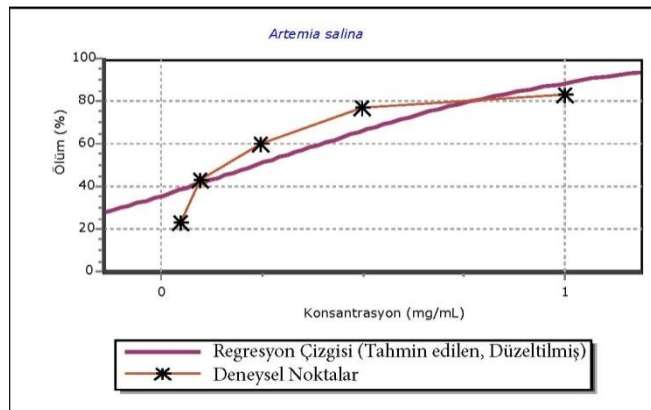
Şekil 3.9: *Anemone coronaria* bitkisinin su yer altı kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği



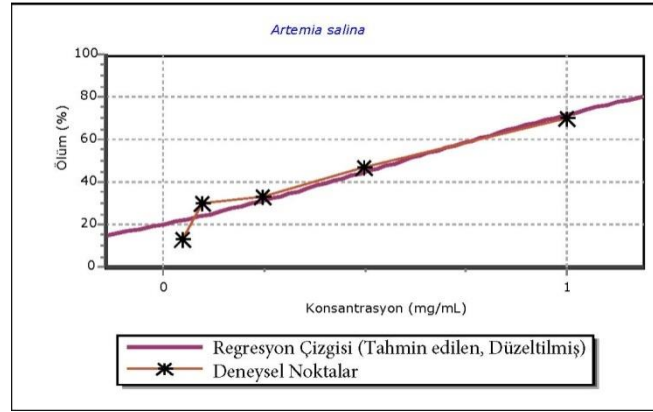
Şekil 3.10: *Anemone coronaria* bitkisinin su yer üstü kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği

Tablo 3.13: *Anemone coronaria* bitkisinin etanol yer altı ve yer üstü kısımlarının *A. salina*'ya karşı ortalama ölüm oranları (%) ve istatistiksel değerleri

	Yer altı Kısmı	Yer Üstü Kısmı
0,05 mg/mL	23.3 ± 0.33	13.3 ± 0.33
0,1 mg/mL	43.3 ± 0.67	30 ± 0.58
0,25 mg/mL	60 ± 0.33	33.3 ± 0.88
0,5 mg/mL	76.7 ± 0.33	46.7 ± 0.33
1 mg/mL	86.7 ± 0.33	70 ± 0.58
Kontrol (dH ₂ O)	3.3 ± 0.33	3.3 ± 0,33
LC₅₀ (min) (mg/mL)	0.10	0.29
LC₅₀ (mg/mL)	0.16	0.45
LC₅₀ (max) (mg/mL)	0.23	0.92
LC₉₀ (mg/mL)	1.51	6.66
x²	0.20	1.08



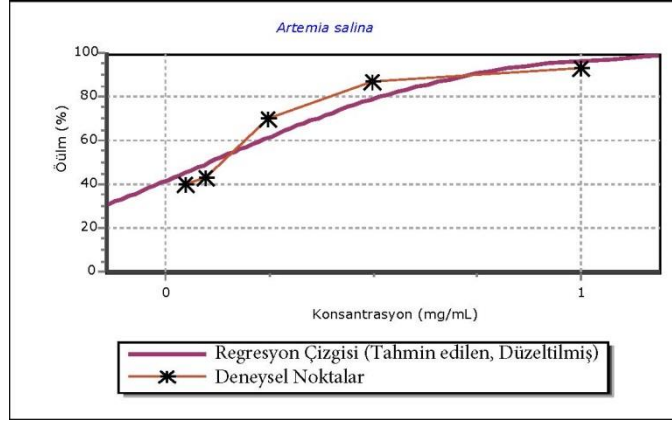
Şekil 3.11: *Anemone coronaria* bitkisinin etanol yer altı kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği



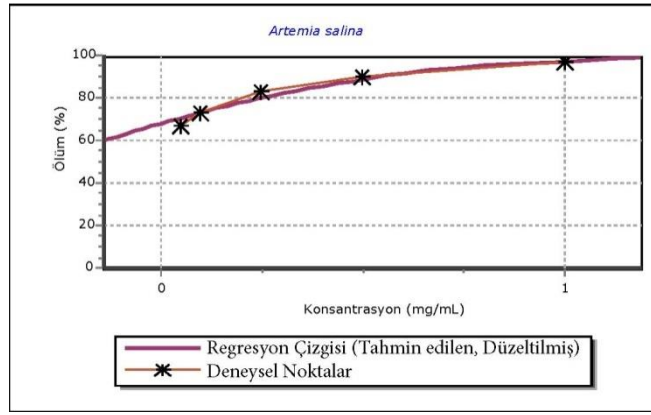
Şekil 3.12: *Anemone coronaria* bitkisinin etanol yer üstü kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği

Tablo 3.14: *Anemone coronaria* bitkisinin aseton yer altı, yer üstü kısımlarının *A. salina*'ya karşı ortalama ölüm oranları (%) ve istatistiksel değerleri

	Yer altı Kısmı	Yer Üstü Kısmı
0.05 mg/mL	40 ± 0.58	66.7 ± 0.33
0.1 mg/mL	43.3 ± 0.88	73.3 ± 0.58
0.25 mg/mL	70 ± 0.58	83.3 ± 0.88
0.5 mg/mL	86.7 ± 0.33	90 ± 0.33
1 mg/mL	93.3 ± 0.33	96.7 ± 0.58
Kontrol (dH₂O)	3.3 ± 0.33	3.3 ± 0.33
LC₅₀ (min) (mg/mL)	0.06	0.001
LC₅₀ (mg/mL)	0.11	0.02
LC₅₀ (max) (mg/mL)	0.14	0.05
LC₉₀ (mg/mL)	0.77	0.44
x²	0.68	0.06



Şekil 3.13: *Anemone coronaria* bitkisinin aseton yer altı kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği



Şekil 3.14: *Anemone coronaria* bitkisinin aseton yer üstü kısmının 24 saatlik yüzde ölüm oranı grafiği

3.2 YPSK (HPLC) Yöntemi İle Standart Fenolik Bileşiklerin Analizi

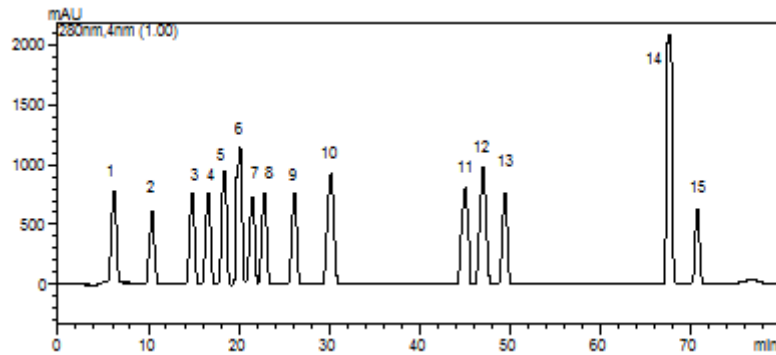
Anemone coronaria türünün etanol yer altı ve yer üstü kısımlarının ekstraktlarından 15 adet fenolik bileşen kantitatif olarak analiz edilmiştir.

Tablo 3.15: Bitkinin etanol yer altı ve yer üstü ekstraktlarının bazı fenolik bileşen içerikleri

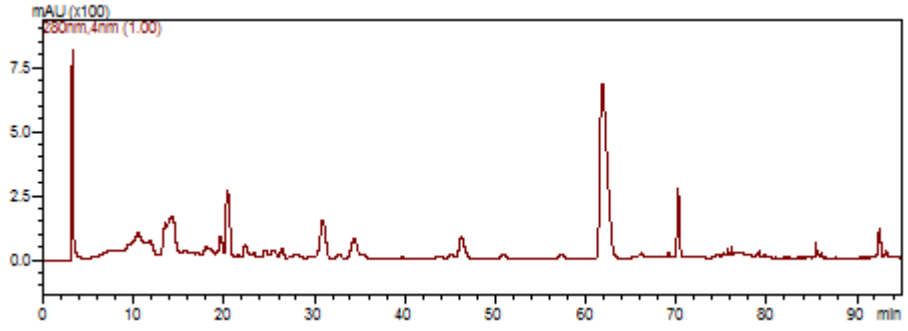
Fenolik Bileşenler	Etanol yer altı	Etanol yer üstü
Gallik asit ($\mu\text{g/g}$)	16.778	116.831
3,4 dihidroksi ($\mu\text{g/g}$)	34.722	251.926
Klorojenik ($\mu\text{g/g}$)	59.384	130.001
Vanilik ($\mu\text{g/g}$)	136.296	308.635
4-hidroksi benzoik asit ($\mu\text{g/g}$)	80.940	42.73
Kafeik asit ($\mu\text{g/g}$)	537.385	2154.815

p-kumarik asit (µg/g)	3.899	126.714
Ferulik asit (µg/g)	0.439	127.315
Sinnamik asit (µg/g)	299.042	17.878
2,5 dihidroksi (µg/g)	12828.860	9414.745
Epikateşin (µg/g)	193.437	409.668
Rutin (µg/g)	56.685	388.686
Ellagik (µg/g)	135.540	622.447
Naringin (µg/g)	13.830	16.230
Kuersetin (µg/g)	0.125	78.352

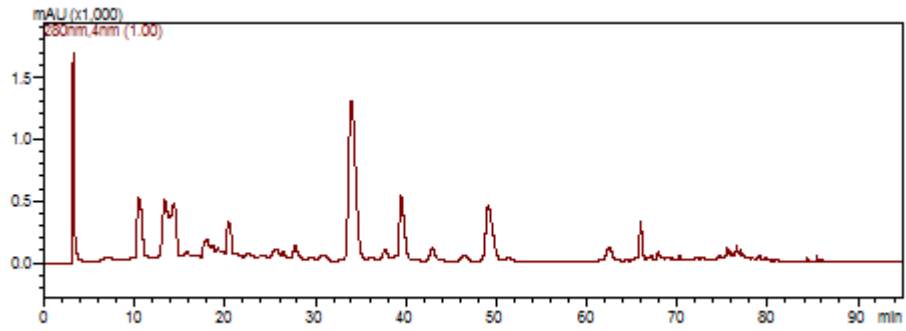
Tabloya bakıldığında, etanol yer altı ve yer üstü ekstraktlarında en yüksek fenolik bileşik içeriği etanol yer üstü ekstraktında kaffeik asit (2154,815 µg/g), en düşük fenolik bileşik içeriği etanol yer altı ekstraktında ferulik asitte (0.439 µg/g) gözlemlenmiştir , Şekil 3.15’de etanol yer altı ve Şekil 3.16’de etanol yer üstü ekstraktının YPSK kromatogramı gösterilmiştir. Şekil 3:17’da gallik asitin, Şekil 3.20’da 3,4- hidroksibenzoik asitin, Şekil 3.21’de 4-hidroksibenzoik asitin, Şekil 3.22’de klorojenik asitin, Şekil 3.23’de vanilik asitin, Şekil 3.24’de kafeik asitin, Şekil 3.25’te p-kumarik asitin, Şekil 3.26’da ferulik asitin, Şekil 3.27’de sinnamik asitin, Şekil 3.28’de 2,5-dihidroksi, Şekil 3.29’da Epikateşin, Şekil 3.30’da Rutinin, Şekil 3.31’de Ellagik asitin, Şekil 3.32’de Kuersetin kalibrasyon eğrileri verilmiştir.



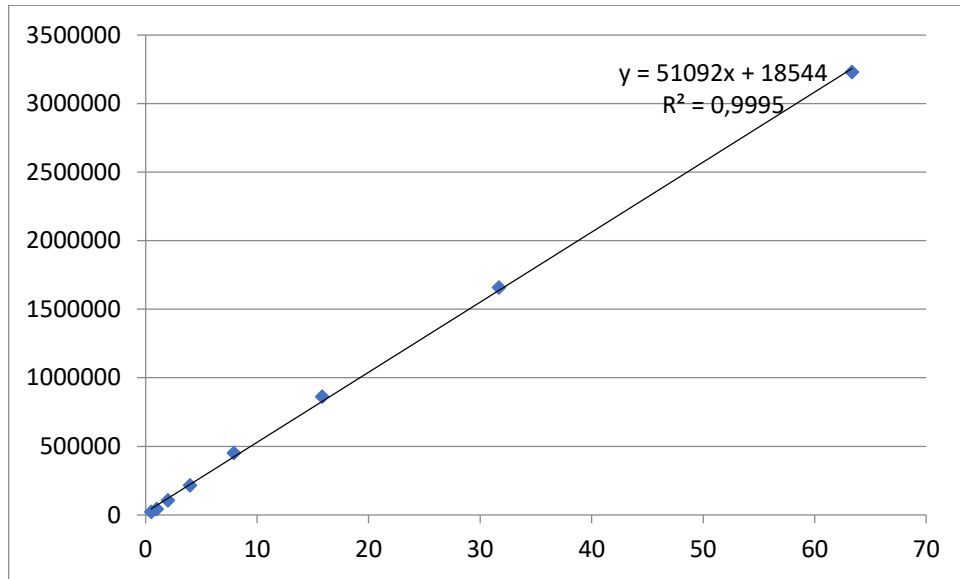
Şekil 3.18: Standart kromatogram



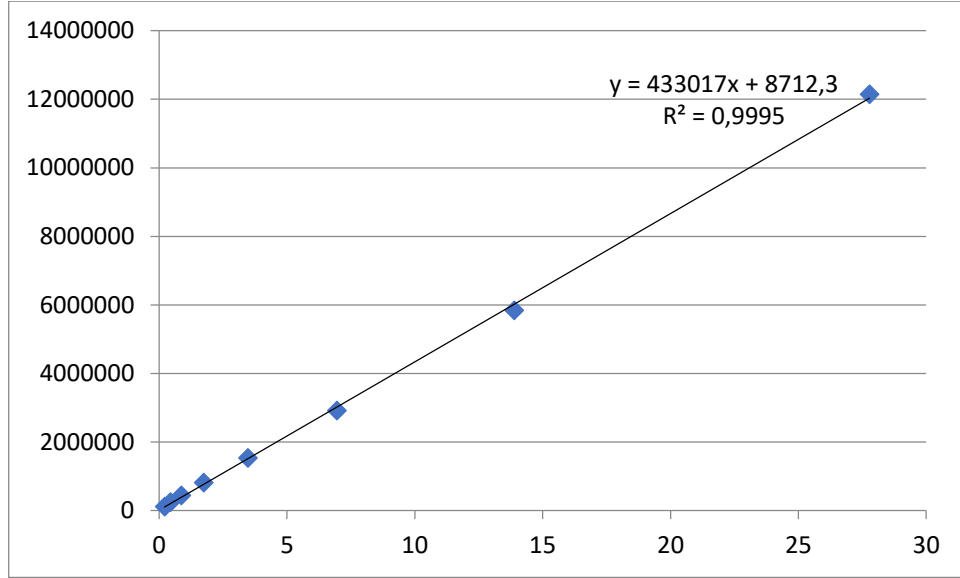
Şekil 3.17: Etanol yer altı ekstraktının YPSK kromatogramı



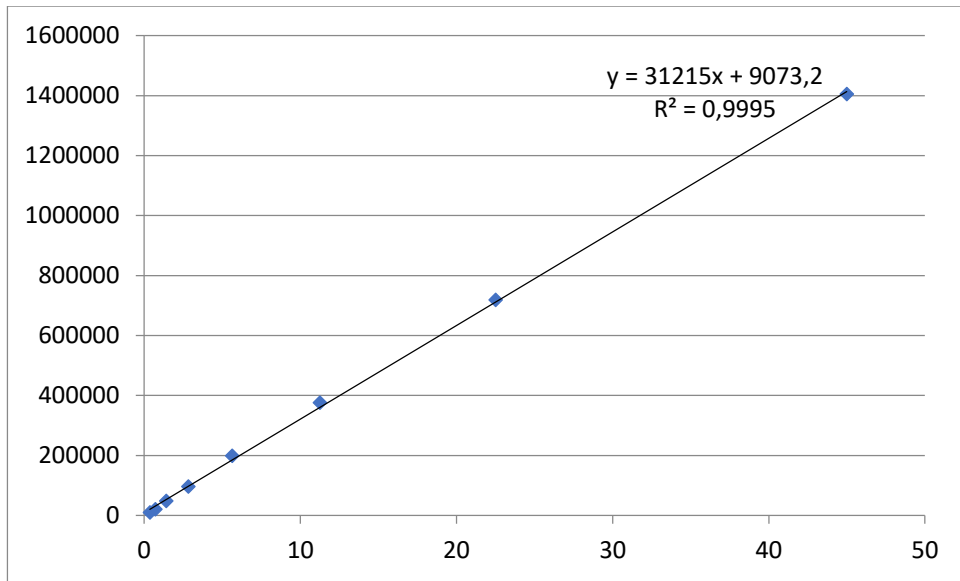
Şekil 3.19 Etanol yer üstü ekstraktının YPSK kromatogramı



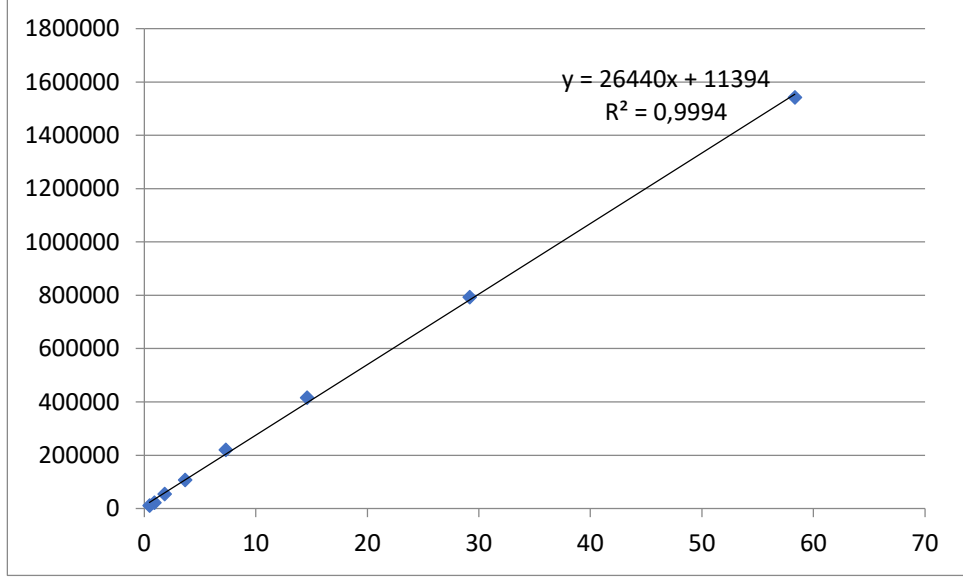
Şekil 3.20 Gallik asit kalibrasyon grafiği



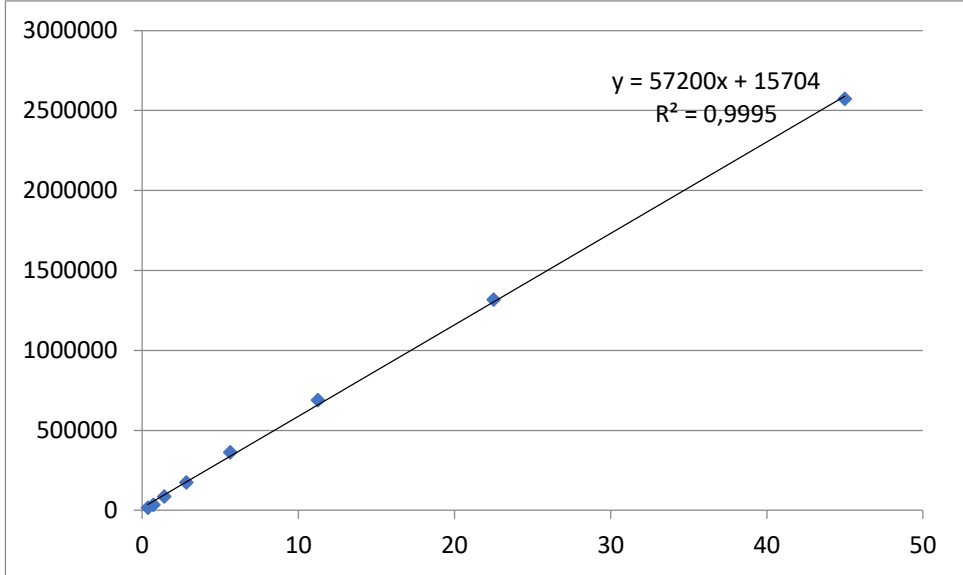
Şekil 3.20: 3,4 dihidroksi kalibrasyon grafiği



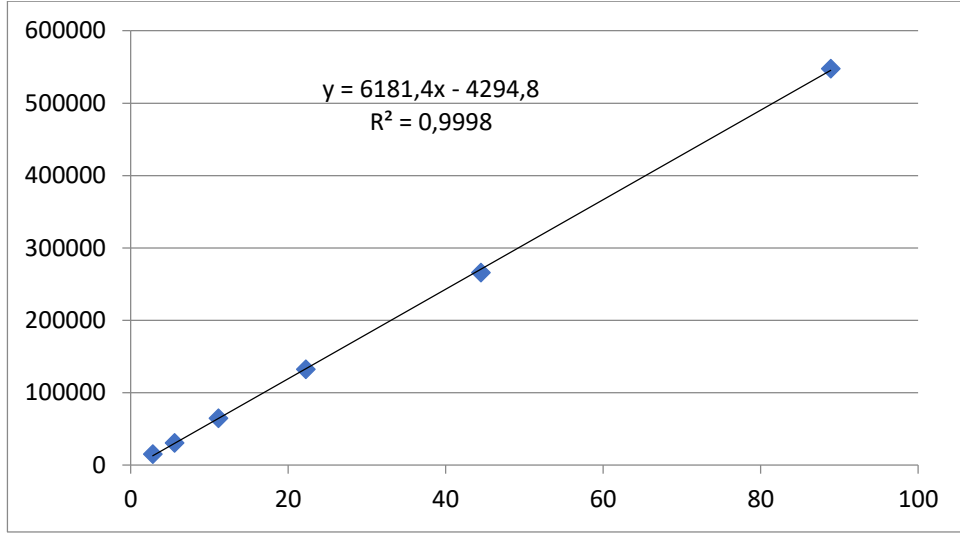
Şekil 3.21: 4-hidroksi kalibrasyon grafiği



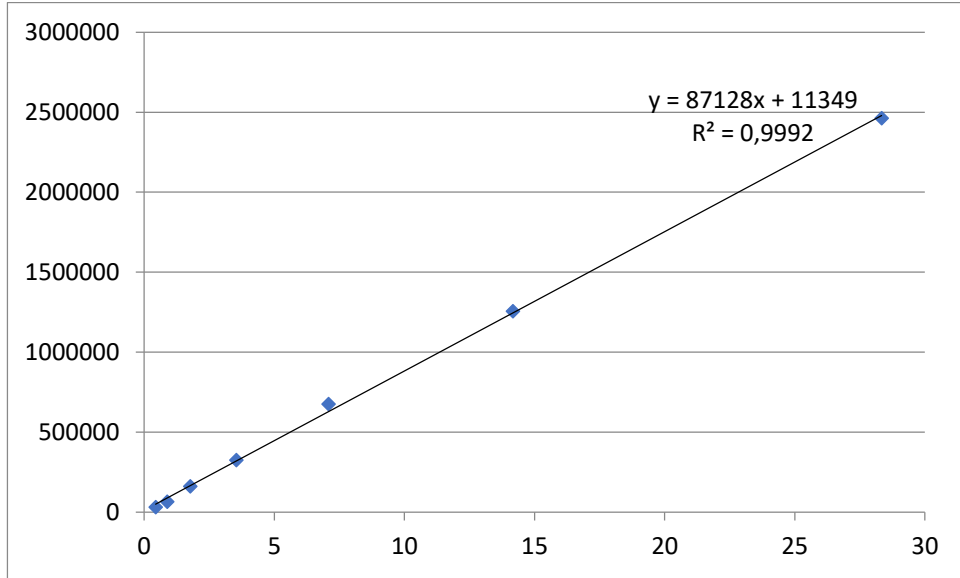
Şekil 3.22: Klorojenik asit kalibrasyon grafiği



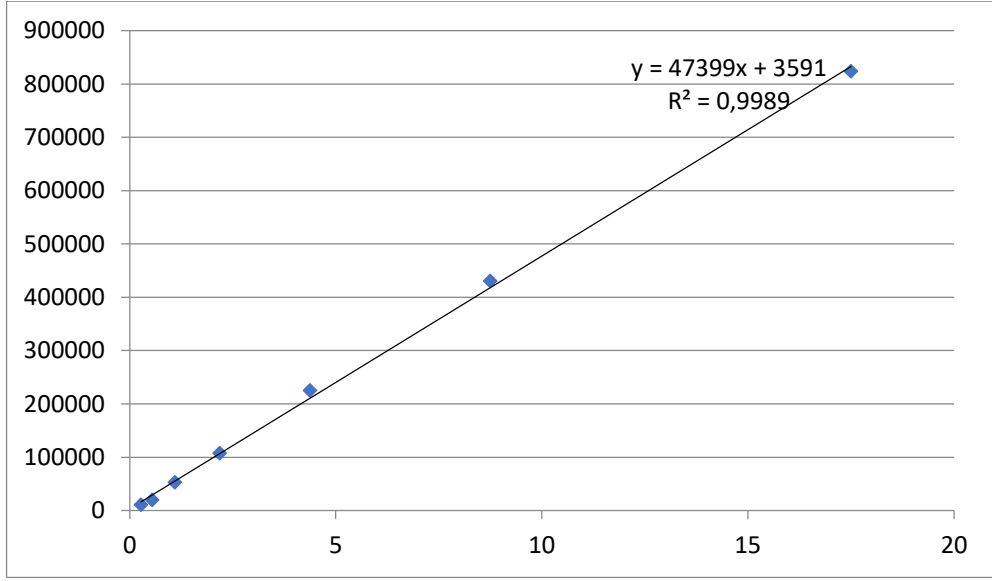
Şekil 3.23: Vanilik asit kalibrasyon grafiği



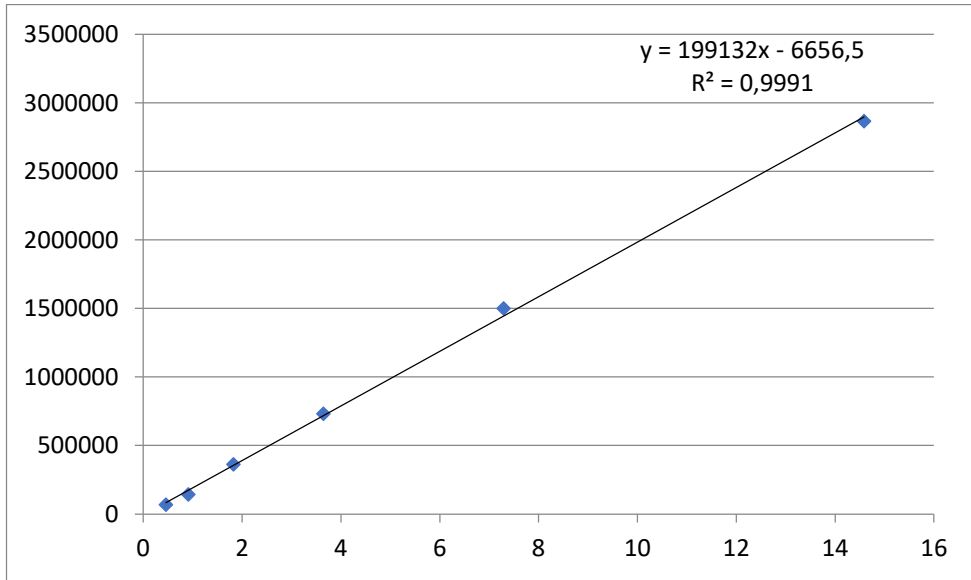
Şekil 3.24: Kafeik asit kalibrasyon grafiği



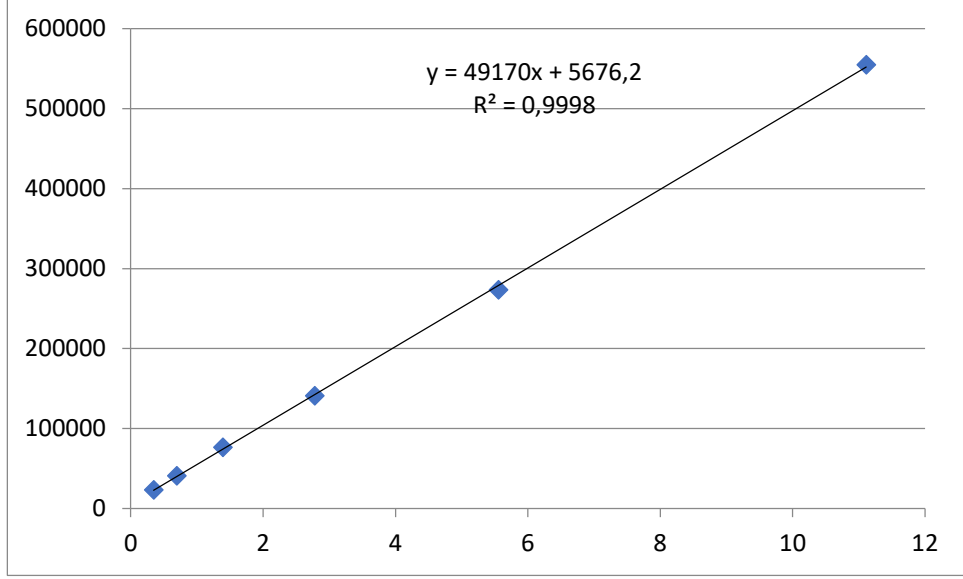
Şekil 3.25: p-Kumarik asit kalibrasyon grafiği



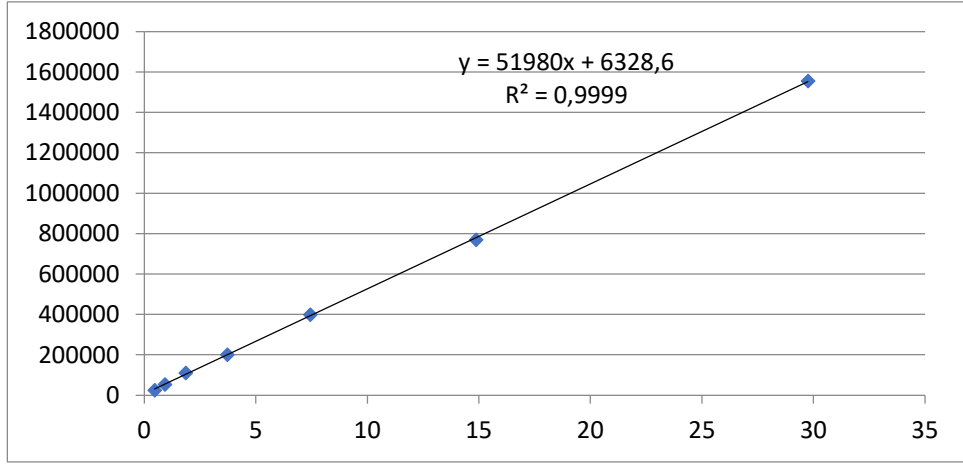
Şekil 3.26: Ferulik asit kalibrasyon grafiği



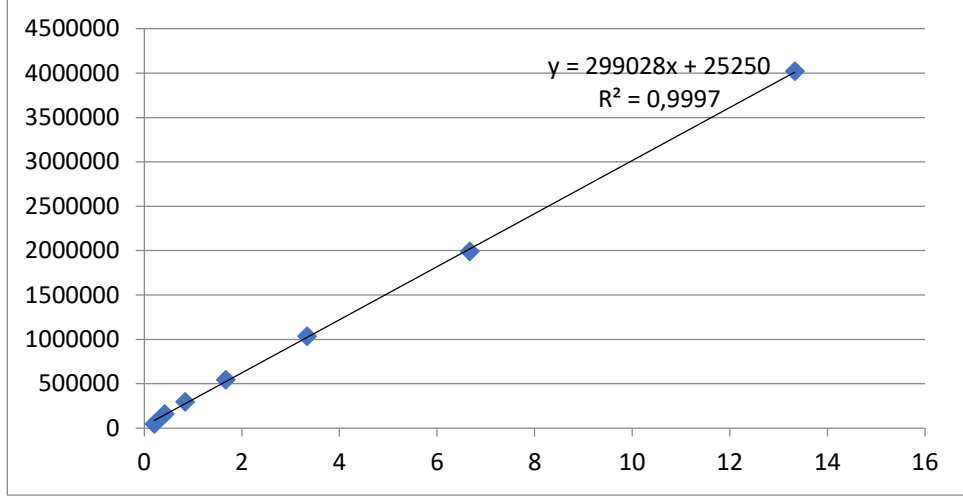
Şekil 3.27: Sınnamik asit kalibrasyon grafiği



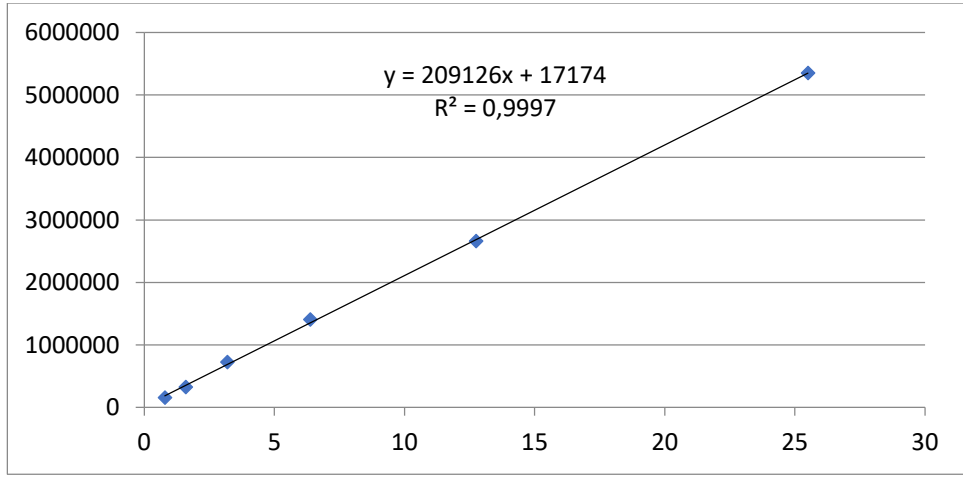
Şekil 3.28: 2,5-dihidroksi kalibrasyon grafiği



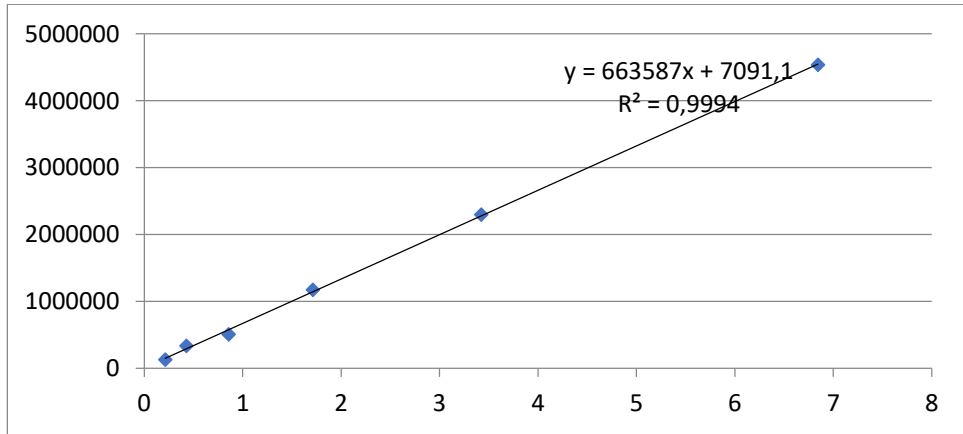
Şekil 3.29: Epikateşin kalibrasyon grafiği



Şekil 3.30: Rutin kalibrasyon grafiği



Şekil 3.31: Ellagik kalibrasyon grafiği



Şekil 3.32: Kuersetin kalibrasyon grafiği

3.1 Tirozinaz Enzim İnhibitör Aktivite Deneyi

Etanol, su, aseton ekstraktlarının tirozinaz enzim aktivitelerine bakılmıştır. Değerler kojik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak en yüksek değeri aseton yer üstü kısmında, en düşük değeri su yer üstü kısmında tespit edilmiştir. Aşağıdaki tabloda değerlerin (%) verileri gösterilmiştir.

Tablo 3.16: Tirozinaz enzimi ekstraktların yer altı ve yer üstü kısımlarının (%) verileri

Su y.ü	Su y.a	Etanol y.ü	Etanol y.a	Aseton y.a	Aseton y.ü
34.275	37.42	38.74	36.05	45.35	55.88

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anemone coronaria türünün kurutulmuş yer altı ve yer üstü kısımlarından elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarıyla antioksidan deneyleri yapılmıştır. Antioksidan deney olarak; DPPH, ABTS radikal giderim aktivitesi, β -karoten-linoleik asit (total antioksidan aktivite), indirgeme gücü kapasitesinin belirlenmesi için (FRAP), Fosfomolibdenyum ve CUPRAC yöntemleri kullanarak deneyler yapılmıştır. Miktar tayin deneyleri ise total flavonoid, total fenolik, tane nmiktar yöntemleri ile yapılmıştır. Bitkinin içermiş olduğu bazı fenolik bileşenlerin içerik tanımları hizmet alımı yolu il HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Bitki ekstraktlarının tirozinaz enzimi inhibitör aktivitelerine bakılmıştır.

Ekstraktların ev sineği (*Musca domestica*) ve sivrisinek (*Culex pipiens*) üzerindeki larvasidal etkisi araştırıldı.

Seçilmiş olan *Anemone coronaria* türü üzerinde yukarıda belirtmiş olduğumuz çalışmalarla ilgili literatürde herhangi bir kaynağa rastlanılmamıştır. Tür üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış olması çalışmanın değerini artırıcı niteliktedir

4.1 Total Antioksidan Aktivite ve Miktar Tayinleri

Serbest radikal giderim aktivitesi, bitki özütü içerisindeki antioksidan bileşiklerin hidrojenlerini verebilmelerine ve süpürücülük etkilerine dayanmaktadır. DPPH radikal giderim aktivitesi mor renkli DPPH çözeltilisine antioksidan ilave

edilmesiyle radikalın rengi antioksidanın varlığı ile sarı renge doğru açılır. Kolay ve basit bir yöntem olarak günümüzde geçerliliğini korumaktadır. Bu yöntemle yapılan bir çalışmaya göre; *Anemone* cinsine ait *Anemone cathayensis* türünde en yüksek inhibitasyon değeri 30.578 ug / mL olarak göstermiştir (Jun-li ve diğ 2012). *Anemone tomentosa* üzerinde yapılan çalışmada en yüksek antioksidan aktivite değeri $IC_{50} = 11.92 \mu M$ olarak göstermiştir (Hao-Bin ve diğ 2011).

Bu yöntemle yapılan DPPH radikal giderim aktivitesi deneyinde su yer üstü kısmında en düşük IC_{50} değeri 0.25 ± 0.06 mg/mL, etanol yer altı ekstraktında IC_{50} değeri 6.39 ± 0.12 mg/mL olarak göstermiştir. Yüksek IC_{50} değeri düşük antioksidan aktiviteye işaret eder. Bu nedenle su yer üstü ekstraktı daha yüksek antioksidan aktiviteye, etanol yer altı ekstraktı daha düşük antioksidan aktivite göstermiştir. Üzerinde çalışılan bitkinin ekstraktlarının aktivitesi, BHA'nin aktivitesi ile karşılaştırıldığında zayıf bir aktivasyon göstermiştir.

Bitki özütlerinin ABTS radikali giderme aktiviteleri 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL ve 250 mg/mL konsantrasyonlarda ölçülmüştür. Konsantrasyona bağlı olarak absorbans değerlerinin düşmesi antioksidan kabiliyetinin arttığını göstermiştir. En yüksek radikal giderim aktivitesinin IC_{50} değerini etanol yer altı kısmında 21.33 ± 0.56 mg/mL olarak göstererek düşük antioksidan aktivite göstermiştir. En düşük radikal giderim aktivitesinin IC_{50} değerini su yer üstü kısmında 4.79 ± 0.01 mg/mL göstererek yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri, β -karoten-linoleik asit oksidasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Yöntem, linoleik asitin inkübasyonu sağlanmaktadır. Antioksidansız ortamda β -karotenin karakteristik sarı rengi açılmaktadır. Solusyon içine antioksidan madde eklenmesi linoleik asitten oluşan peroksit ürünlerinin nötralize edilmesi ile β -karotenin karakteristik sarı rengi korunmuş olur . (Hidalgo, 1994) *Anemone coronaria* bitkisinin bu yöntemle yapılan radikal giderim aktivitesinde en yüksek değeri aseton yer altı kısmında 79.16 mg/mL, en düşük değeri etanol yer altı kısmında 20.58 mg/mL göstermiştir.

Toplam fenolik madde miktarı ile yapılan başka bir *Anemone* türü üzerinde yapılan çalışmada (*Anemone sylvestris*) diploid ve tetraploid bitkiler arasında karşılaştırılma yapılmıştır. Sonuç olarak 67.1 ± 8.5 ila 118.4 ± 2.57 mg GAE/g ve 62.7 ± 5.9 ila 131.7 ± 13.5 mg GAE/g kuru arasında değişen farklılıklar göstermiştir. Kesirlerin karşılaştırılmasında, tetraploid bitkilerin polifenollerin diploid olanlardan daha zengin olduğu gözlenmiştir (Pavla ve diğ 2018). fenolik madde miktarı en yüksek aseton yer üstü kısmında 68.33 ± 0.003 mg/mL GAE/g, en düşük değeri su yer altı kısmında 29.16 ± 0.00 mg/mL GAE/g olarak görülmüştür. Fenolik maddeye yüksek değere sahip olan özütün antioksidan aktiviteye sahip olacağı sonucuna varılmıştır.

Flavonoidler bitkilere kırmızı ve turuncu rengi veren, iltihap karşıtı maddeler bulduran birleşiklerdir. Toplam flavonoid miktarı kuersetin'e eşdeğer olarak en yüksek miktarı aseton yer üstü kısmında 118.42 mg QE/g, en düşük etanol yer altı kısmında 11.64 mg/mL QE/g olarak tespit edilmiştir.

Tanenler insanlar tarafından tüketilen bir çok bitkilerde bulunmaktadır. Bitkilerde doğal olarak bulunan polifenollerdir ve bitkiler üzerinde besleyici değere sahiptirler. İçerdikleri tanen miktarı seviyeleri faydalı olabilecek düzeylerden ölüme yol açabilecek düzeylere kadar değişiklik göstermektedir (Aydın 2006). Bu çalışmamızda da *Anemone coronaria* bitkisinin toplam tanen miktarına bakılmıştır. Toplam tanen miktarı kateşin kalibrasyon grafiğinden çıkan denklemle hesaplanmıştır. En yüksek tanen miktarı aseton yer üstü kısmında 55.49 ± 0.05 mg/mL , en düşük tanen miktarı su yer altı kısmında 0.45 ± 0.00 mg/mL tespit edilmiştir.

4.2 İndirgeme Gücü Kapasitesi

İndirgeme kapasitesi tayininde ekstraktlarının Fe+3'ü Fe+2'ye indirgeye bilmesi incelendi. İndirgeme gücü, bitkilerdeki antioksidan özelliğin önemli bir belirteçidir (Peksel ve diğ. 2006). Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu yöntemde, Fe+3/ferrisiyanür kompleksinin ferro formuna dönüşmesi ile Prusya mavisi renk oluşur ve artan konsantrasyon ile rengin

yoğunluğu da artmaktadır. Bu artışın yoğunluğu ölçülerek (absorbans) indirgeme kapasitesi belirlenir. Pavla ve arkadaşlarının *Anemone sylvestris* bitkisi için diploid ve tetraploid bitkiler arasındaki karşılaştırmada sırasıyla tetraploid bitkiler için 25.5 ± 4.0 ila 192.3 ± 2.8 mg TE g⁻¹ ve diploid bitkiler için 21.0 ± 3.1 ila $159.4 \pm 10,0$ mg TE g⁻¹ arasında değişmiştir. *A.coronaria* coronaria türünün su,aseton,etanol ekstraktları ile yapılan indirgeme kapasitesi yönteminde ekstraktların indirgeme kapasitesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. En yüksek indirgeme kapasitesi aseton yer altı kısmında 73.41 ± 0.00 mg/mL olarak göstermiştir. En düşük indirgeme kapasitesi 1.54 ± 0.00 mg/mL olarak etanol yer altı kısmında göstermiştir.

Fosfomolibdenyum deneyinde standart askorbik asite eşdeğer olarak hesaplamalar yapılmıştır. Deney Mo(VI) , Mo(V) e indirgemesi prensipine dayalıdır. Prosedür için hazırlanmış aseton, su, etanol ekstraktlarından en yüksek IC₅₀ değerini 60.33 ± 0.00 mg/mL aseton yer üstü kısmı göstermiştir. En düşük IC₅₀ değer etanol yer altı kısmında 7.13 ± 0.00 mg/mL göstermiştir.

Cuprak yöntemi antioksidan bileşiklerin Cu(II)-neokuproin kompleksini Cu(I)-neokuproin kompleksine indirgemesi prensipine dayanmaktadır. Toma ve arkadaşlarının (2015) Ranunculaceae familyası *Nigella damascena* türü üzerinde antioksidan çalışma yapılmıştır. Cuprak yöntemi ile yaptıkları indirgeme kapasitesi deneyinde (26.1 ± 1.01 TE / g) değer bulmuşlar. Başka bir çalışmada Ranunculaceae familyasına ait *Nigella sativa* (çörek otu)tohumu yağının üzerinde yapılan antioksidan çalışmada indirgeme kapasitesi olarak Cuprak yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak yüksek indirgeme kapasitesi (40.55 ± 0.04 µg/mL) göstermiştir (Sıcak ve Erdoğan Eliuz 2019).

A.coronaria ile yaptığımız indirgeme kapasitesi deneyin de en yüksek IC₅₀ değeri etanol yer üstü kısmında (15.39 ± 0.04 µg/mL TE/g) göstermiştir.

A.coronaria su, etanol, aseton ekstraktlarının metal şelatlama kabiliyeti demir-ferrozin kompleksi ölçülerek belirlenmiştir. Şelatlama kabiliyeti Fe^{+ 2} çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar EDTA ile karşılaştırılmıştır. En yüksek şelatlama kabiliyeti etanol yer üstü kısmında (0.25 ± 0.039 µg/mL) göstermiştir. Kolak ve arkadaşlarının (2006) *Delphinium linearilobum* üzerinde yaptıkları çalışmada metal

şelatlama kapasitesi ($92.60 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$) göstermiştir.

4.3. Bitki Ekstraktlarının Sitotoksik ve Larvasidal Etkileri

Bu çalışmada *Anemone coronaria* türünün yer altı ve yer üstü kısımlarının etanol, su ve aseton çözücülerıyla elde edilmiş ekstraktlarının *Artemia salina* türüne karşı sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Test sonucuna göre aseton, etanol ve su ekstraktlarının LC_{50} değerlerine göre suyer üstü kısmında en düşük değer (8.44 mg/mL), en yüksek değer ise suyer altı kısmında (4.03 mg/mL), etanol yer altı kısmında (0.23 mg/mL) etanol yer üstü kısmında (0.92 mg/mL), aseton yer altı kısmında (0.14 mg/mL) yer üstü kısmında (0.05 mg/mL) olarak tespit edilmiştir.

Sinekler patojen mikroorganizmaların potansiyel taşıyıcıları olarak kabul edilmektedir. Mücadele için larvasidal maddeler kullanılmaktadır. Mücadele için kullanılan yaygın larvasidal maddelere karşı direnç kazanmaya başlarlar. Bu durum zararlı böcek popülasyonlarının kontrolünü zorlaştırmaktadır. Larvasidal maddelerin doğru kullanılması son derece önemlidir.

Bu çalışmada *Anemone coronaria* bitkisinin su yer altı ve yer üstü ekstraktlarından yapılan larvasidal etki deneyi için *Musca domestica* (ev sineği) ve *Culex pipiens* (sivri sinek) larvaları kullanılmıştır. *Musca Domestica* ile yapılan başka bir çalışmada Mansour ve arkadaşları 10 farklı aileye ait toplam 11 ekstrakt ev sineği *Musca domestica* L'ye karşı detaylı toksisite değerlendirmesine tabi tutmuşlar. *Piper nigrum* için larvasidal LC_{50} değerleri (50.1 ppm), *Azadirachta indica* (76.9 ppm), *Conyza aegyptiaca* (77.0 ppm) ve *Cichorium intybus* (96.8 ppm); *Punica granatum* özütü, en düşük toksisiteye sahiptir (213.9 ppm) (Mansour 2011).

Anemone coronaria türünün su yer altı ve yer üstü ekstraktları ile yapılan larvasidal etki deneyi için kullanılan *Musca domestica* (ev sineği) larvalarının büyük çoğunluğu 2 ve 3. evreden olmuştur. Su yer altı kısmında larvasidal LC_{50} değerleri (12.07 mg/mL), su yer üstü kısmında (3.05 mg/mL) olarak bulunmuştur. Yukarıda verilmiş olan bitkilerle karşılaştırıldığında *Anemone coronaria* zayıf bir toksisiteye sahiptir.

Culex pipiens ile *Cyclamen parviflorum* ve *Cyclamen alpinum* üzerinde larvasidal etki deneyi yapılmış türler arasında en düşük öldürücü konsantrasyon *Cyclamen alpinum* türünün yer altı kısmında 72 saat sonucunda 151.87 ppm olarak gözlenirken en yüksek öldürücü konsantrasyon *Cyclamen parviflorum* türünün yer altı kısmında 24 saat sonucunda 1821.60 ppm olarak bulunmuştur (Turan 2016). *Culex pipiens* (sivri sinek) ile yapılan larvasidal etki deneyi için *Anemone coronaria* bitkisinin su yer altı ve yer üstü ekstraktları kullanılmıştır. Deney sonucu hiç bir ölüme rastlanılmadığından istatistiksel hesaplama yapılamamıştır. Sonuç olarak *Anemone coronaria* bitkisi diğer örneklerle karşılaştırıldığında *Culex pipiens* üzerinde hiç bir larvasidal etkiye sahip olmamıştır.

Brine shrimp genel toksisite deneyi sonucuna göre, bitki ekstraktlarının LC₅₀ değerine en yüksek değer su yer üstü kısmında (8.44 mg/mL), en düşük değer ise aseton yer üstü kısmında (0.05 mg/mL) olarak elde edilmiştir.

4.4. YPSK (HPLC) Yöntemi İle Fenolik Bileşiklerin Elde Edilmesi

Wen-Cai ve arkadaşlarının (2001) *Anemone anhuiensis* (Ranunculaceae) türünün rizomlarında bilinen 3 saponin birlikde 4 yeni oleanan triterpen tespit etmişler. Bunlar sırasıyla 3-O-aa-L-rnopiranosil- (1 → metil 2) -bb-D-ksilopiranosil oleanolik asit 28-O-bb-D-glikopiranosil- (1 → metil 6) -bb-D-glikopiranosil ester, 3-O-bb-D-ksilopiranosil oleanolik asit 28-O-aa-L-rnopiranosil- (1 → metil 4) -bb-D-glikopiranosil- (1 → metil 6) -bb-D-glikopiranosil ester, 3-O-a-L-rampiranosil- (1 →→2)-bb-D-glukopiranosil oleanolic acid 28-O-aa-L-rhamnopyranosil- (1 →→ 4) – bbD-glikopiranosil- (1 → 6) -bb-D-glikopiranosil ester, 3-O-bb-D-glikopiranosil- (1 → metil 3) -aa-L-rhamnopyranosil- (1 → metil 2) -bb-D-ksilopiranosil oleanolik asit 28-O-aa-L-rnopiranosil- (Sırasıyla, 1 → Cinsiyet 4) -bb-D-glikopiranosil- (1 → Cinsiyet 6) -bb-D-glikopiranosil ester olarak açıklanmıştır.

Thomson ve arkadaşlarının (1983) yaptığı çalışmada ise Avustralya deniz anemonu *Actinia tenebrosa*'dan yeni uyarıcı protein olan tenebrosin-A HPLC ile tespit edilmiştir.

Bonora ve arkadaşlarının (1987) Ranunculaceae türleri üzerinde protoanemoninin dağılımı ve kantitatifliği üzerine bir HPLC çalışması yapılmış.

Sonuçlar, protoanemoninin, bu aile içindeki sistematik ilişkilerin aydınlatılmasında yararlı bir kimyasal belirteç olabileceği kanaatine varmışlar.

Protoanemoninin taze bitkiden elde edilebilen doymamış basit laktonlardır. Bitki dokularının yaralanması sonucu enzimatik olarak ranunkulinden meydana gelmektedir. Bu familyadaki bitki ekstraktlarında görülen antibiyotik aktivite protoanemoninden ileri geldiği düşünülmektedir. Protoanemonin β -angelikaiakton yapısındadır. *Anemone coronaria* bitkisi ile yapılan antibakteriyal testi sonucu bitkide bulunan protoanemonin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 'ye bakterilerine karşı daha çok etkilidir (Bingöl ve diğ 2018).

Anemone coronariae tanol yer altı ve yer üstü ekstraktlarının HPLC cihazı ile fenolik bileşik dağılımına ait kromatogramlardaki piklerin tanımlanması için bir seri fenolik asit standardı (gallik asit, 3,4 dihidroksi benzoik asit, 4-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeikasit, p-kumarikasit, ferulik asit, sinnamik asit, 2,5 dihidroksi benzoik asit, rutin, ellagic, naringin, quercetin, vanilik, epikateşin) enjekte edilmiştir. Ekstraktlara ait kromatogramlardaki piklerin geliş zamanları ve spektrumları bu standartlarla karşılaştırılarak türlerin içerdiği fenolik asitler tanımlanmaya çalışılmıştır. Standart maddelere ait kalibrasyon eğrileri ve denklemleri kullanılarak tanımlanan fenolik bileşiklerin miktarları hesaplanmıştır. Ekstraktların fenolik bileşik dağılımını belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar sonucunda 15 farklı fenolik bileşik tespit edilmiştir. *Anemone coronaria* etanol yer altı ve yer üstü ekstraktlarında sırasıyla etanol yer altı 0.125 $\mu\text{g/g}$ kuersetin, etanol yer altı 0.439 $\mu\text{g/g}$ ferulik asit, etanol yer altı 3.899 $\mu\text{g/g}$ p-kumarik asit, etanol yer altı 13.830 $\mu\text{g/g}$ etanol yer altı, etanol yer üstü 16.230 $\mu\text{g/g}$ naringin, etanol yer altı 16.778 $\mu\text{g/g}$ gallik asit, etanol yer üstü 17.878 $\mu\text{g/g}$ sinnamik asit, etanol yer üstü 42,873 $\mu\text{g/g}$ 4-hidroksi benzoik asit, etanol yer altı 56.685 $\mu\text{g/g}$ rutin, etanol yer üstü 78.352 $\mu\text{g/g}$ kuersetin, etanol yer üstü 116.831 $\mu\text{g/g}$ gallik asit, etanol yer üstü 126.714 $\mu\text{g/g}$ p-kumarik asit, etanol yer üstü 127.315 $\mu\text{g/g}$ ferulik asit, etanol yer üstü 130.001 $\mu\text{g/g}$ klorojenik asit, etanol yer altı 136.296 $\mu\text{g/g}$ vanilik asit, etanol etanol yer altı 193.437 $\mu\text{g/g}$ epikateşin, etanol yer üstü 251,926 $\mu\text{g/g}$ 3,4 dihidroksibenzoik asit, etanol yer altı 299.042 $\mu\text{g/g}$ sinnamik asit, etanol yer üstü 308,635 $\mu\text{g/g}$ vanilik asit, etanol yer üstü 388.686 $\mu\text{g/g}$ rutin, etanol yer üstü 409,668 $\mu\text{g/g}$ epikateşin, etanol yer altı 537,385 $\mu\text{g/g}$ kafeik asit, etanol yer üstü

622.447µg/g ellagik, etanol yer üstü 2154,815 µg/g kafeik asit, etanol yer üstü 9414.745 µg/g, etanol yer altı 12828.860 µg/g, 2,5 dihidroksi benzoik asit belirlenmiştir. Sonuç olarak YPSK yöntemi ile elde edilen fenolik bileşiklerden en yüksek etanol yer 12828.860 µg/g 2,5 dihidroksi benzoik asitte gözlenirken, en düşük etanol yer altı etanol yer altı 0.125µg/g kuersetin gözlenmiştir. Fenolik bileşiklere ait kalibrasyon eğrileri Şekil 3:18 ve Şekil 3:31" de görüldüğü gibidir.

4.5 Tirozinaz Enzim İnhibitör Aktivitesi

Tirozinaz (polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz, dihidroksi-Lfenilalanin: oksijen oksidoredüktaz (E.C 1.14.18.1)) olarak adlandırılan bir enzimdir. İnsanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde bulunan melanin pigmenti içerir. Kofaktörü bakırdır.

Çakmak ve arkadaşlarının (2017) *Medicago rigidula (L)*. üzerinde yaptıkları enzim inhibitasyon aktivite deneyi sonucu tirozinaz enzim aktivitesi (16.36±0.85 mg KAE/g) olarak bulmuşlar.

Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının(2018) *Dactylorhiza osmanica* üzerinde yaptıkları çalışmada ise bitkinin IC50 değeri anlamlı bulunmamıştır.

A.coronaria üzerinde yaptığımız çalışmada ise en yüksek yüzde değer aseton yer üstünde 55.88 mg KAE/g, en düşük değer su yer üstünde ise 34.275 mg KAE/g bulunmuştur.

Yapılan çalışmalar göz önünde bulundüğünde *A.coronaria* türü ekstraktlarının antioksidan aktiviteye, zengin sekonder metabolit içeriğine farklı biyolojik özelliklere sahip bir bitki olduğu ortaya konulmuş olur. Tür ekstraktlarının bu özellikleri onların fitokimyasal olarak etkili olduklarını, bazı farmakolojik özellikler taşıdıklarını ve ileride tıbbi amaçlar için kullanılabilirliğine olanak yaratmaktadır. Tüm bunlar tür üzerinde ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

Aydın, S, A., Üstün,F., Tanenler Kimyasal Yapıları, Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemleri, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg*, 33 (1), 21-31, (2007).

Amin, I., Zamaliah, MM., Chin, WF., “Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables” *Food Chem*, 87, 581-586, (2004).

Anonim., Medicinal and Aromatic Plants Working Group-ECP/GR, (2005).

Overwalle,V., *Medicinal and Aromatic Plants*, Chapter 9, (2007).

Anonim., DPI VIII.Beş Yıllık Kalkınma Planı. Sus Bitkileri Özel İhtisas Komisyonu Raporu, (2001).

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E. and Ercag, E., The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5/6), 292-304, (2006).

Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A., Legret P., “Standardization d’une extrait de propolis et identification des principaux constituents”, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, 462- 468, (1994).

Alvarez M.A., Plant Biotechnology for Health : From Secondary Metabolites to Molecular Farming, *Springer International Publishing*, (2014).

Asiye,A., Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Anabim Dalı*, (2008-2009).

Alasalvar,C., Grigor, JM., Zhang,D., Quantick,PC., Shahidi,F., Comparison of volatiles, phenolics,sugars, antioxidant vitamins, and sensoryquality of different colored carrot varieties, *J Agric Food Chem* ,9(3):1410-6, (2001).

Ahmed,MM., Alı,SE., Protective effect of pomegranate peel ethanol extract against ferric nitrilotriacetate induced renal oxidative damage in rats, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 35-43, (2010).

Bingöl,F., Şener,B., Koyuncu,M., Akin,S., Türkiyede Yetişen Bazı Ranunculaceae Familyası Bitkilerin Protoanemonin Yönünden İncelenmesi, *Gazi Üniversitesi Fen*

Biimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi Farmakoljik Ana Bilim Dalı, (2018).

Bahar,B,S., Betül,Y., Tirozinaz Enziminin Giresun Yöresinde Yetişen Yenilebilir Kanlıca Mantarından (*Lactarius salmonicolor*) Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 10-23, (2018).

Baser, H.C., Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Endüstriyel Kullanımı, *TAB Bülteni*,19-43,(1998).

Baser, K.H.C., 1997. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin İlaç ve Alkollü içki Sanayinde Kullanımı, İstanbul Ticaret Odası Yayın No:39, (1997).

Blois,M.S., “Antioxidant Determination by the Use of A Stable Free Radical”, *Nature*, 181, 1199-1200, (1958).

Brand-Williams,W., Cavalier, M. E., Berset,C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, 28(1): 25-30, (1995).

Burcu,E., Aylin,S,Ç., Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları, *Journal of Health Services and Education*, 51-57, (2017).

Başköşe, İ., Paksoy, M.Y., Selvi, S., Geophytic Plants Around The Akkaya Dam Lake (Niğde-Turkey), XI.International Symposium on Flower Bulbs and *Herbaceous Perennials*, Antalya, Turkey, 28 March-1 April , (2012).

Baytop, T., Türkiye de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, (1999).

Bourgaud,F., Gravot,A., Milesi,S., Gontier,E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science*,839–851,(2001).

Claudia-Crinaç,T.,Neli-Kingaç,O., Vlase,L., Cristina,M., Mocan,M., Comparative Studies on Polyphenolic Composition, Antioxidant and Diuretic Effects of *Nigella sativa* L. (Black Cumin) and *Nigella damascena* L. (Lady-in-a-Mist) Seeds, *Molecules*, 20(6), 9560-9574, (2015).

Cemal,K., Recep,P., Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve İnsan sağlığına etkileri, *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi* , 3(5): 226-234, (2015)

Çapanoğlu,E., Boyacıoğlu,D., Meyve ve Sebzelerin Flavonoid İçeriği Üzerine İşlemenin Etkisi , *Akademik Gıda Dergisi*, 41-46,(2009).

Czapek,F., Spezielle Biochemie, Biochemie der Pflanzen , 3 , G. Fischer Jena ,369,

(1921) .

Çalımlı,A., Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi, *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi*, Ankara, (2003).

Çakmak,Y,SÇ, Zengin,G., Eskin,E., Yıldırım,K., Topal, M., Aydın,G,H., Ünlü,Ü., Baydemir,M., Erten,E., *Medicago rigidula* (L.) ALL.'nın Antioksidan ve Enzim İnhibisyon Aktiviteleri ve Fenolik Bileşiminin İncelenmesi, *Marmara Pharmaceutical Journal* ,21(3),522-529, (2017).

Çağlar, S.S., “Karasinek *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)’nın sentetik pyrethroid grubu insektisitlerden Tetramethrin (Neo-Pynamine)’e dirençli populasyonlarında gün uzunluğunun populasyon dinamizmi üzerine etkileri”, Bilim Uzmanlığı Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (1987).

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*. 52, 794-804, (2004).

Duh, P. D., Yen, W. J., Du, P. C., & Yen, G. C., “Antioxidant Activity Of Mung Bean Hulls”, *Journal Of The American Oil Chemists’ Society*, 74, 1059-1063, (1997).

Davis,P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, *University Pres*, 95- 203, (1965).

Duygu,Ö., Tirosinaz Enziminin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Fenollerin Gideriminde Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği*, (2007).

Finney,D.J., Probit Analysis, 3rd end,*Cambridge University Press*, Cambridge, (1971).

Hidalgo M.E., Fernandez E., Guilhot,W., Lissi E, Antioxidant Activity of Depsides and Depsidones, *Phytochemistry*, 37, 1585-1587, (1984).

Hüseyin,Ç., Atila,Y., Antalya kentinde bulunan Sivrisinek (Diptera: Culicidae) türleri, üreme alanları ve baskın tür *Culex pipiens* L.’in bazı özellikleri, *Türk. entomol. Derg.*, 28 (4), 283-294, (2004).

Hao-Bin, H., Xu-Dong, Z., Yu-Feng, Jian., Jian-Xin, L., Ji-Hua Z., Constituents of the Root of *Anemone tomentosa*, *Arch Pharm Res*, 1097-1105, (2011).

Halliwell,B., Gutteridge,JMC., Free Radicals in Biology and Medicine, *Oxford University Press*,10-121,(1999).

Hayrullah,K., Mehmet,Ş,G., Antioksidanlar, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı*,15030, Burdur, 1(1),(2016).

Isman,M.B., Neem and other botanical insecticides: Barriers to commercialization, *Phytoparasitica*, 25(4): 339-344, (1997).

Jun-li,W., Kun,L., Wei-zhen, G., Qian, W., Dong-ting,X., Ming-fei, L., Kai-li ,Bi., Yun-fei ,S.,Anticancer, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Anemone (*Anemone cathayensis*), *Food Sci. Biotechnol*, 21(2), 551-557, (2012).

Keskin,H., Erkmen G., Besin Kimyası, Güryay Matbaacılık İstanbul, Beşinci basım:25-35,(1987).

Kolak,U., Öztürk,M,Ç., Özgökçe,Ö., Ulubelen,A., Norditerpene alkaloids from *Delphinium linearilobum* and antioxidant activity, *Phytochemistry*, 2170-2175, (2006).

Kaya, S., Karabıdak, M., S., Çevik, U., “2-Amino-6-(N-İzopropil) Kumar, S.A, *Plants-based Medicines in India*, (2009).

Kossel,Über., Chemische Zusammensetzung der Zelle, *Archiv für Physiologie*, 181–186,(1891).

Kim,Y., Kim,DC., Cho,ES., KoSO., Kwon,WY., Suh,GJ., Shin,HK., Antioxidant and anti-inflammatory effects of selenium in oral buccal mucosa and small intestinal mucosa during intestinal ischemia-reperfusion injury, *J Inflamm*, (2014).

Kinnula,VL., Crapo,JD., Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors, *Free Radic Biol Med*, 36: 718-44,(2014).

Madeira, VMC., Almeida, LM., Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 161–169, (1994).

Lange, D., International Trade in Medicinal and Aromatic Plants, *Medicinal and Aromatic Plants*, 155-170, (2006).

Meyer,B.N.,Ferrigni,N.R.,Putman,J.E., Jaccobsen,L.B., Nichols,D.E., Maslauglin,J.L., Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents,*Planta Med*, 31-34, (1982).

Moon Yj, Wang X, Morris Me., “Dietary Flavonoids”, Effects On Xenobiotic And Carcinogen Metabolism, *Toxicology In Vitro*, 20, 187-210, (2006).

Mansour,S,A., Bakr,R,F,A., Mohamed,R,I,H asaneen,N,M., Larvasidal Activity of Some Botanical Extracts, Commercial Insecticides and their Binary Mixtures Against the Housefly, *Musca Domestica* L, *The Open Toxinology Journal*, 4, 1-13,(2011).

Merve,B., Gökçe,T., Ahmet,B., Nurşen,B., Bitkisel Kaynaklı Fenolik Yapıdaki Bileşikler ve Sağlığa Yararlı Etkileri, *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi*, (2015).

Massey ,V., Willams,CH.,On the Reaction Mechanism of Yeast Glutathione Reductas, *J.Biol. Chem.* 4470-4480, (1965).

Morris,P., Robbins,M., Manipulating the Chemical Composition of Plants. <http://www.aber.ac.uk/en/media/ch2.pdf> (Erişim tarihi: 04/02/2009) (1997).

Mammadov,R., *Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler*, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti.(2014).

N.Deniz., *Crocus cancellatus Herbert subsp. mazziaricus* (Herbert) Mathew ve *Crocus pallasii Goldb. subsp. pallasii Goldb.* Taksonları Ekstraktlarının Aktif Bileşenleri ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı*, (2016).

Nezahat, K.,Bazı *Anemone* L. (*Ranunculaceae*) Türleri Üzerinde Karşılaştırmalı Anatomik Bir Araştırma, *Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi* 21 (1), 25-31, (2009).

Oyaizu, M., “Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine”, *Jpn J. Nutr.*103, 413-419, (1986).

Olaf,S., Jan,EE,K., Alan,CK., Frederik JGM van,K., Lutein ve Zeaksantin kaynaklı olan meyve ve sebzeler: İnsan gözündeki maküler pigment, *British journal of Ophthalmology*, 82(8), (1998).

Oomah,BD., Mazza,G., Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops,*Trends in Food Science and Technology*, 193–198, (1999).

Pavla,Z., Eloy,F., Jana,S., Jana,Z., JoseLuis,R., Domingo,M., Daniela,R., Luigi,M., Morphological, physiological and genomic comparisons between diploids and induced tetraploids in *Anemone sylvestris* L., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, February, 317–327,(2018).

- Pietta, P-G., Flavonoids as antioxidants, *J NatProd*, 63(7),1035-42, (2000).
- Peksel, A., Arısan-Atac, I., Yanardag, R., “Antioxidant activities of aqueous extracts of purslane (*Portulaca oleracea subs sativa* L.)”, *Italian Journal of Food Science*, 18, 295- 308, (2006).
- Prieto,P., Pineda,M., Aguilar,M., Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphormolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E, *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341, (1999).
- Payne,G.F., Bringi,V., Prens,C., Shuler,M.L., Sıvı Sistemlerde Bitki Hücre ve Doku Kültürü , Hanser , 1 – 10, (1991) .
- Ramazan,C., Türkiye Endemiği *Lathyrus Czezzottianus* (Fabaceae) ’un Antioksidan Kapasitesi ve Bazı Farmasotik Enzimler Üzerine İnhibitör Etkilerinin İncelenmesi,Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı*,(2015).
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., “Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237, (1999).
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology Medicine*, 26, 1231–1237, (1999).
- S. Aslı ,A., Fulya,Ü., Tanenler Kimyasal Yapıları,Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemleri, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*33 (1), 21-31, (2007).
- Sıcak,Y., Erdoğan Eliuz,E,A., Chemical Content and Biological Activity Spectrum of *Nigella sativa* Seed Oil, *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 22(6):928-934, (2019).
- Seyid,A. S.,Selami,S., Ekrem,A., Alaşehir (Manisa) ve Çevresinde Yetişen Bazı Geofitlerin Etnobotanik Açıdan İncelenmesi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 29(2):170-177, (2013).
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E., Tohumlu Bitkiler Sistematiği, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116, 4. Baskı, İzmir, (1995).
- Shinde, A., Ganu, J., Naik, P., Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative

stress: A Review, *J Dent Allied Sci*, 63- 66, (2012).

Şekeroğlu, N., Aydın, K., Gözüaçık, H.G., Kulak, M., Kilis ilinde yetişen geofitler, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(1), 199-201, (2012).

Şendoğan,T., Hative,Ç., Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (2) 09-29, (2015).

Şener, G., Yeğen, B Ç., İskemi Reperfüzyon Hasarı, *Klinik Gelişim Dergisi*, 22: 5-13,(2009).

Usta,B., Yılmaz-Ersan,L., Sütün Antioksidan Enzimleri ve Biyolojik Etkileri, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 123-130,(2013).

Ünver, S., “Bazı Neonikotinoid İnsektisitlerin *Drosophila melanogaster*'de Ömür Uzunluğu ile Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkileri ve Olası Toksik Etkilerinin Çeşitli Bitki Ekstraktları Kullanılarak İyileştirilmesi Üzerine Arastırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı*, (2015).

Thomson, M., Moritz,R,L., Simpson,R,J., Norton,R,S., Tenebrosin-A, A New Cardıostimulant Proteın from The Australian Sea Anemone *Actinia Tenebrosa*, This manuscript was published in *Biochemistry International*, 711-718, OCT (1987).

Turgay,K.,P erihan,G., Gülsüm,Y., Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği ve Antioksidan Özellikleri ,*İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, Cilt 5, Sayı 1 (2017).

Turan,M., *Cyclamen alpinum* ve *Cyclamen parviflorum* Ekstraktlarının Fenolik Bileşenleri ve Bazı Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Ünivesitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı*, (2016).

Turgay,K.,P erihan,G., Gülsüm,Y., Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği ve Antioksidan Özellikleri ,*İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, Cilt 5, Sayı 1 (2017).

Valko,M., Leibfritz,D., Moncola,J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-8, (2007).

Wu, C., Chen, F., Wang, X., Kım, H., He, G., Haley-zıtlın, V., Huang, G.,“Antioxidant constituents in fewerfew (*Tanacetum parthenium*) extract andtheir chromatographic quantification”, *Food Chem.*, 96, 220–227, (2006).

Wanasundara, N., Shahıdı, F., “Antioxidant and Prooxidant Activity of Green Tea

Extracts İn Marine Oils”, *FoodChemistry*, 63,335-42, (1998).

Woodall, AA., Britton,G., Jackson,MJ., Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability, *Biochim Biophys Acta*,575–586, (1997).

Wen-Cai,Y.,Qing-Wen, Z.,Shou-Xun, Z., Chun-Tao, C.,Four New Oleanane Saponins from *Anemone anhuiensis*, *Chem. Pharm. Bull.* 49(5) 632—634, (2001).

Yavaşer,R.,Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması,Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi, Kimya Ana Bilim Dalı*, (2011).